

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN MARTÍN – TARAPOTO
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE AGROSILVO PASTORIL
ESCUELA PROFESIONAL DE AGRONOMÍA



TESIS

“ACCIÓN BIOLÓGICA DE *Clonostachys* sp SOBRE *Meloidogyne incognita* EN *Plukenetia volubilis*, BAJO CONDICIONES CONTROLADAS.”

**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:
INGENIERO AGRÓNOMO**

**PRESENTADO POR LA BACHILLER:
MARÍA JAQUICEL SANTA CRUZ TARRILLO**

**TARAPOTO – PERÚ
2017**

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN MARTÍN - TARAPOTO
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE AGROSILVO PASTORIL
ESCUELA PROFESIONAL DE AGRONOMÍA
ÁREA DE MEJORAMIENTO Y PROTECCIÓN DE CULTIVOS

TESIS

“ACCIÓN BIOLÓGICA DE *Clonostachys* sp SOBRE *Meloidogyne*
incognita EN *Plukenetia volubilis*, BAJO CONDICIONES
CONTROLADAS”

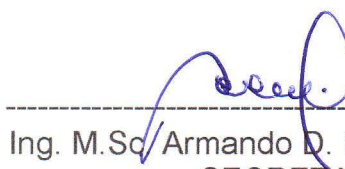
PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:
INGENIERO AGRÓNOMO

PRESENTADO POR LA BACHILLER:
MARÍA JAQUICEL SANTA CRUZ TARRILLO

COMITÉ DE JURADO



Dr. Winston Franz Ríos Ruiz
PRESIDENTE



Ing. M.Sc. Armando D. Cueva Benavides
SECRETARIO



Ing. M.Sc. Manuel S. Doria Bolaños
MIEMBRO



Ing. Eybis José Flores García
ASESOR

TARAPOTO – PERÚ
2017

ÍNDICE

Resumen

Summary

	Pág.
I. INTRODUCCIÓN	1
II. OBJETIVOS	2
III. REVISIÓN DE LITERATURA	3
3.1. Generalidades de sachá inchi	3
3.1.1. Origen	3
3.1.2. Importancia del cultivo	3
3.1.3. Características fenológicas	4
3.2. Plagas y enfermedades	5
3.3. Nemátodo del nudo (<i>Meloidogyne incognita</i>)	5
3.3.1. Morfología de las hembras	6
3.3.2. Morfología de los machos	6
3.3.3. Sintomatología	6
3.4. Control biológico	7
3.5. Hongos endófitos	8
3.5.1. Potencial antagonista de microorganismos endofíticos	8
3.5.2. Descubrimiento e historia de los hongos endófitos	9
3.5.3. Clasificación de los hongos endófitos	10
3.5.4. Relación hongo endófito-planta hospedera	10
3.5.5. Papel ecológico de los hongos endófitos	11
3.5.6 <i>Clonostachys</i> sp	11
3.6. Antecedentes de investigación con hongos endófitos	14
IV. MATERIALES Y METODOLOGÍA	16
4.1. MATERIALES	16
4.1.1. Ubicación del trabajo de investigación	16
4.1.2. Ecotipos utilizados	16
4.1.3. Aislamientos de <i>Clonostachys</i> sp endófito de sachá inchi	17

4.2. METODOLOGÍA	18
4.2.1. Incremento de Inóculo de <i>Clonostachys</i> sp	18
4.2.1.1. Preparación de medio de cultivo	18
4.2.1.2. Reactivación de cepas e incremento de inóculo	19
4.2.2. Capacidad endofítica de <i>Clonostachys</i> sp colectada de Plántulas de <i>Plukenetia volubilis</i> .	20
4.2.2.1. Producción de plántulas de sachá inchi	20
4.2.2.2. Preparación de sustrato	21
4.2.2.3. Colonización de <i>Clonostachys</i> sp	22
4.2.2.4. Evaluación de la capacidad endofítica de <i>Clonostachys</i> sp colectadas de plántulas de <i>Plukenetia volubilis</i>	24
4.2.3. Capacidad del hongo endófito <i>Clonostachys</i> sp como promotor de crecimiento de plántulas de <i>Plukenetia volubilis</i>	25
4.2.4. Determinar la acción biológica del hongo endófito <i>Clonostachys</i> sp sobre <i>Meloidogyne incognita</i> en <i>Plukenetia volubilis</i>	27
4.2.4.1. Obtención de plántulas	27
4.2.4.2. Infestación de plántulas con <i>Meloidogyne incognita</i>	27
4.2.4.3. Cuantificación de nódulos	28
4.2.4.4. Análisis de datos	29
4.2.5. Capacidad del hongo endófito <i>Clonostachys</i> sp de inducir tolerancia en plantas de <i>Plukenetia volubilis</i> al estrés hídrico	29
4.2.6. Diseño experimental	30
V. RESULTADOS Y DISCUSIONES	32
5.1. RESULTADOS	
5.1.1. Capacidad endofítica de <i>Clonostachys</i> sp colectada de plantas de <i>Plukenetia volubilis</i> .	32
5.1.2. Influencia del hongo endófito <i>Clonostachys</i> sp como promotor de crecimiento de plantas de <i>Plukenetia</i>	

	<i>volubilis</i> .	33
5.1.3.	Acción biológica del hongo endófito <i>Clonostachys</i> sp sobre <i>Meloidogyne incognita</i> en <i>Plukenetia volubilis</i> .	39
5.1.4.	Capacidad del hongo endófito <i>Clonostachys</i> sp de inducir tolerancia en plantas de <i>Plukenetia volubilis</i> al estrés hídrico.	43
5.2.	DISCUSIONES	46
5.2.1.	Capacidad endofítica de <i>Clonostachys</i> sp colectada de plantas de <i>Plukenetia volubilis</i> .	46
5.2.2.	influencia del hongo endófito <i>Clonostachys</i> sp como promotor de crecimiento de plantas de <i>Plukenetia volubilis</i> .	46
5.2.3.	acción biológica del hongo endófito <i>Clonostachys</i> sp sobre <i>Meloidogyne incognita</i> en <i>Plukenetia volubilis</i>	48
5.2.4.	Capacidad del hongo endófito <i>Clonostachys</i> sp de inducir tolerancia en plantas de <i>Plukenetia volubilis</i> al estrés hídrico.	50
VI.	CONCLUSIONES	52
VII.	RECOMENDACIONES	54
VIII.	BIBLIOGRAFÍA	55
	ANEXOS	

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Página
1 Cepas del hongo endófito <i>Clonostachys</i> sp colectado de diferentes partes de plantas de sachá inchi.	17
2 Diseño experimental	31
3 Análisis de varianza de la capacidad endofítica de cepas de <i>Clonostachys</i> sp, endófitos en plantas de sachá inchi (<i>Plukenetia volubilis</i>).	32
4 Análisis de varianza de la altura de plantas de sachá inchi colonizadas con cepas de <i>Clonostachys</i> sp	34
5 Análisis de varianza del área foliar de plantas de sachá inchi colonizadas con cepas de <i>Clonostachys</i> sp	35
6 Análisis de varianza del número de hojas por planta de sachá inchi colonizadas con cepas de <i>Clonostachys</i> sp	36
7 Análisis de varianza del peso de biomasa fresca total de plantas de sachá inchi colonizadas con cepas de <i>Clonostachys</i> sp	37
8 Análisis de varianza para la longitud de raíces de plantas de sachá inchi colonizadas con cepas de <i>Clonostachys</i> sp	38
9 Análisis de varianza del número de nódulos producidos por <i>Meloidogyne incognita</i> en plantas de sachá inchi, después de 45 días de haber sido incubadas a temperatura ambiente en invernadero	39
10 Análisis de varianza de la longitud de raíz (cm) de plantas de sachá inchi, después de 45 días de haber sido incubadas a temperatura ambiente en invernadero.	41
11 Análisis de varianza de la altura (cm) de plantas de sachá inchi, después de 45 días de haber sido puestas en desarrollo a temperatura ambiente en invernadero	42
12 Análisis de varianza del porcentaje de agua de plantas de sachá inchi, después de 45 días de haber sido puestas a evaluación a temperatura ambiente en vivero	43
13 Análisis de varianza de la longitud de raíz de plantas de sachá inchi, después de 45 días de haber sido puestas a evaluación a temperatura ambiente en vivero.	44

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1 Instalaciones del Laboratorio de Bioprotección y del vivero ubicadas en el Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana (IIAP-San Martín)	16
2 Semillas de sachá inchi, accesión Shica	17
3 Preparación de medio Papa Sacarosa Agar (PSA).	19
4 Reactivación e incremento de inóculo de cepas de <i>Clonostachys</i> sp	20
5 Pre – germinado de semillas de sachá inchi	21
6 Preparación de sustrato.	22
7 Colonización de sustrato con cepas de <i>Clonostachys</i> sp.	23
8 Siembra de semillas de sachá inchi en suelo colonizado con cepas de <i>Clonostachys</i> sp orientando la radícula hacia abajo.	23
9 Evaluación de la capacidad endofítica de cepas de <i>Clonostachys</i> sp hacia plantas de sachá inchi.	25
10 Infestación de plantas de sachá inchi con <i>Meloidogyne incognita</i>	28
11 Plantas de sachá inchi inoculadas con cepas de <i>Clonostachys</i> sp inducidas a estrés hídrico	30
12 Prueba de Duncan ($p<0.05$) para el porcentaje (%) de colonización de <i>Clonostachys</i> sp endófito de sachá inchi (<i>Plukenetia volubilis</i>) en placas conteniendo medio PSAO (papa sacarosa agar más oxitetraciclina).	33
13 Prueba de Duncan ($p<0.05$) para la altura de plantas colonizadas con cepas de <i>Clonostachys</i> sp endófito de sachá inchi.	34
14 Prueba de Duncan ($p<0.05$) para la altura de plantas colonizadas con cepas de <i>Clonostachys</i> sp endófito de sachá inchi	35
15 Prueba de Duncan ($p<0.05$) para el número de hojas por planta de sachá inchi colonizada con cepas de <i>Clonostachys</i> sp.	36
16 Prueba de Duncan ($p<0.05$) para el peso de biomasa fresca total de plantas de sachá inchi colonizadas con cepas de <i>Clonostachys</i> sp.	37
17 Prueba de Duncan ($p<0.05$) para la longitud de raíces de plantas de	38

sacha inchi colonizadas con cepas de *Clonostachys* sp.

- 18 Prueba de Duncan ($p < 0.05$) para el número de nódulos producidos por *Meloidogyne incognita* en plantas de sachá inchi después de 45 días de haber sido incubadas a temperatura ambiente en invernadero, considerando el ciclo biológico del nemátodo (25 a 35 días). 40
- 19 Prueba de Duncan ($p < 0.05$) para la longitud de la raíz (cm) de plantas de sachá inchi después de 45 días de haber sido incubadas a temperatura ambiente en invernadero. 41
- 20 Prueba de Duncan ($p < 0.05$) para la altura (cm) de plantas de sachá inchi después de 45 días de haber sido puestas en desarrollo a temperatura ambiente en invernadero, indicando una tasa de crecimiento de la altura cada cinco días por aislamiento. 42
- 21 Prueba de Duncan ($p < 0.05$) para el porcentaje de agua Altura (%) de plantas de sachá inchi, después de 45 días de haber sido puestas a evaluación a temperatura ambiente en vivero. 44
- 22 Prueba de Duncan ($p < 0.05$) para la longitud de raíz (cm) de plantas de sachá inchi, después de 45 días de haber sido puestas a evaluación a temperatura ambiente en vivero. 45

RESUMEN

Se evaluó la acción biológica de *Clonostachys* sp sobre *Meloidogyne incognita* en *Plukenetia volubilis*, bajo condiciones controladas en el Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana. Se utilizó 15 cepas de *Clonostachys* obtenidas de la micoteca del IIAP- San Martín. Se evaluó la capacidad endofítica de *Clonostachys* sp colectadas de plántulas de *Plukenetia volubilis*, también se evaluó la influencia de *Clonostachys* sp como promotor de crecimiento, además se determinó la acción biológica de *Clonostachys* sp sobre *Meloidogyne incognita* en *Plukenetia volubilis*, y también se determinó la capacidad de *Clonostachys* de inducir tolerancia en plántulas de *Plukenetia volubilis*. Se inoculó *Clonostachys* a semillas de *Plukenetia volubilis*, para las evaluaciones mencionadas, donde obtuvimos resultados favorables en la colonización de todas las cepas de *Clonostachys* sp colectadas del tallo de *Plukenetia volubilis* siendo el T2 (CLO-70) que logró colonizar al 100%; en las evaluaciones de altura de planta, en la influencia como promotor de crecimiento de *Clonostachys* sp, se obtuvo una altura superior respecto al control el T14 (CLO-127) con 24,17 cm; en tanto para la longitud de raíz en la evaluación de acción biológica, obtuvimos como el mejor al T8 (CLO-96) CON 17,67 cm; y para la evaluación de porcentaje de agua en la capacidad de inducir tolerancia al estrés hídrico, el resultado no fue lo esperado, todos los tratamientos obtuvieron un resultado parecido. Se recomienda estudiar más a profundamente a *Clonostachys* sp porque se está comprobando que es un hongo endófito que se desarrolla dentro de la planta de *Plukenetia volubilis* y tiene buena colonización.

PALABRAS CLAVES: Endófito, Sacha inchi, Nemátodo, *Clonostachys* y hongos.

SUMMARY

The biological action of *Clonostachys* sp on *Meloidogyne incognita* in *Plukenetia volubilis* was evaluated under controlled conditions at the Research Institute of the Peruvian Amazon. We used 15 strains of *Clonostachys* obtained from the library of IIAP-San Martín. The endophytic capacity of *Clonostachys* sp collected from *Plukenetia volubilis* seedlings was evaluated, as well as the influence of *Clonostachys* sp as a growth promoter. In addition, the biological action of *Clonostachys* sp on *Meloidogyne incognita* was determined in *Plukenetia volubilis*, and the capacity Of *Clonostachys* to induce tolerance in seedlings of *Plukenetia volubilis*. *Clonostachys* was inoculated with seeds of *Plukenetia volubilis*, for the aforementioned evaluations, where we obtained favorable results in colonization of all strains of *Clonostachys* sp collected from the stem of *Plukenetia volubilis* I feel the T2 (CLO-70) that managed to colonize to 100%; In the plant height evaluations, in the influence as growth promoter of *Clonostachys* sp, a higher height was obtained with respect to the control the T14 (CLO-127) with 24,17 cm; As for the root length in the biological action evaluation, we obtained the best at T8 (CLO-96) WITH 17.67 cm; And for the evaluation of water percentage in the capacity to induce tolerance to water stress, the result was not expected, all treatments obtained a similar result. It is recommended to study more deeply *Clonostachys* sp because it is being verified that it is an endophyte fungus that develops inside the plant of *Plukenetia volubilis* and has good colonization.

KEY WORDS: Endophyte, Sacha inchi, Nematode, *Clonostachys* and Fungus.

I. INTRODUCCIÓN

El cultivo de *Plukenetia volubilis* L, conocido como maní del monte (sacha inchi), viene introduciéndose al mundo de la economía agrícola, porque sus valores alimenticios y medicinales tienen un gran potencial en carbohidratos y aceites insaturados del tipo omega.

En la actualidad la problemática principal es el ataque del nemátodo del nudo, *Meloidogyne incognita*, que causa agallas en las raíces, impidiendo el normal funcionamiento fisiológico y el transporte de agua, afectando los procesos fotosintéticos, de respiración, disminuyendo el rendimiento de la producción agrícola.

Existen varios métodos de control de nemátodos en otros cultivos, que pueden ser aplicados en el cultivo de sacha inchi, y contribuir con la reducción de esta enfermedad.

La utilización de agentes biológicos como los hongos endófitos demuestra que puede ser una alternativa de control contra el ataque del nemátodo del nudo *Meloidogyne incognita* en el cultivo de sacha inchi, demostrando ser uno de los métodos de control más eficiente debido a su bajo costo, preservación e inocuidad del medio ambiente, por su fácil adaptación al medio en que es utilizado y por su elevada residualidad.

II. OBJETIVOS

2.1. Objetivo general

Determinar la acción biológica del hongo endófito *Clonostachys* sp por su capacidad de protección biológica a *Plukenetia volubilis* frente al ataque de *Meloidogyne incognita* bajo condiciones controladas.

2.2. Objetivos específicos

Evaluar la capacidad endofítica de *Clonostachys* sp colectadas de plántulas de *Plukenetia volubilis*.

Evaluar la influencia de *Clonostachys* sp como promotor de crecimiento del hongo endófito en plántulas de *Plukenetia volubilis*.

Determinar la acción biológica del hongo endófito *Clonostachys* sp sobre *Meloidogyne incognita* en *Plukenetia volubilis*.

Determinar la capacidad del hongo endófito *Clonostachys* sp de inducir tolerancia en plántulas de *Plukenetia volubilis* al estrés hídrico.

III. REVISIÓN DE LITERATURA

3.1. Generalidades de sachá inchi

3.1.1. Origen

Sachá Inchi, es una euphorbiaceae que comúnmente se conoce como maní del monte, sachá maní o maní del inca, está distribuida desde América Central y en el Perú se le encuentra en estado silvestre en diversos lugares de San Martín, Ucayali, Huánuco, Amazonas, Madre de Dios y Loreto, se adapta a suelos arcillosos y ácidos y se desarrolla mejor en climas cálidos, tiene características muy favorables para la reforestación, la siembra de este cultivo se realiza con tutores vivos al contorno de los cerros (laderas), protegería a los suelos de la erosión indiscriminada, situación en la que se encuentran la mayoría de los suelos de la Región San Martín (Manco, 2006).

3.1.2. Importancia del cultivo

Los componentes principalmente son: proteínas, aminoácidos, ácidos grasos esenciales (omegas 3, 6, y 9) y vitamina E (tocoferoles y tocotrienoles) en contenidos significativamente elevados, respecto de semillas de otras oleaginosas (maní, palma, soya, maíz, colza y girasol), contiene aceites, omegas y vitamina E de importancia nutricional y terapéutica para el consumo que puede controlar radicales libres y una serie de enfermedades que estos originan en el organismo humano (Manco, 2006).

Su producción se inicia a los 6,5 meses del trasplante, obteniéndose en el primer año rendimientos promedios de 0,7 a 2,0 t/ha, se desarrolla en asociación, con cultivos de cobertura, alcanzando edades hasta de 10 años. (Manco, 2006).

3.1.3. Características fenológicas

Es un arbusto trepador o rastrero silvestre y cultivado que se le encuentra en bordes de bosques secundarios, en cañaverales (*Gynerium sagittatum*), sobre cercos vivos como malezas en platanales y cultivos perennes (Manco, 2006).

En suficiente humedad, la germinación se inicia aproximadamente a las dos semanas de realizada la siembra, una semana después, aparece la segunda hoja verdadera y el tallo guía, la floración, se inicia aproximadamente a los 3 meses (90 días) luego de realizado el trasplante, apareciendo primero los primordios florales masculinos e inmediatamente después los femeninos, en un período de 7 a 19 días, las flores masculinas y femeninas completan su diferenciación floral (Manco, 2006).

Se inicia la formación de los frutos completando su desarrollo a los 4 meses después de la floración, luego se inicia la maduración propiamente dicha de los frutos, cuando están de color verde empiezan a tornarse de un color negrusco, que finalmente se convierte en marrón oscuro o negro cenizo; indicador que está listo para la cosecha, este proceso de maduración del fruto dura aproximadamente de unos 15 a 20 días, iniciándose la cosecha a los 7,5

meses después de la siembra y/o trasplante, con una producción continua (Arévalo, 2000).

3.2. Plagas y enfermedades

Los ataques de *Meloidogyne* sp pueden ser a temprana edad, en suelos ácidos, alcalinos, franco arenoso con más del 70% de arena, arcillosos con más del 50% de arcilla y materia orgánica; análisis de muestras de suelo y raíces de *Plukenetia volubilis* de la Estación Experimental El Porvenir, realizados en los laboratorios de la Sede Central La Molina - INIA, reportan la presencia de dos géneros de nemátodos: *Meloidogyne* y *Aphelenchus* con poblaciones de 217 y 14 nemátodos/100g de suelo respectivamente, esto indica una alta población de *Meloidogyne* sp, confirmándolo como una plaga de importancia (Arévalo, 2000).

Las plantas atacadas por *Meloidogyne* sp se atrofian y presentan entrenudos cortos, hojas pequeñas, luego se vuelven cloróticas, así mismo, estos parásitos ingresan a las raíces produciendo heridas por donde fácilmente penetran los hongos (*Fusarium* sp, *Macrophomina* sp), dañando los tejidos y produciendo la pudrición total de las raíces, causando finalmente la muerte de las plantas (Arévalo, 2000).

3.3. Nemátodo del nudo (*Meloidogyne incognita*)

Es el nemátodo de mayor importancia en el mundo debido a las grandes pérdidas que puede ocasionar al afectar las raíces de numerosos hospedantes con que cuenta (hortalizas, frutales, leguminosas, etc.), este

nemátodo produce nódulos en las raíces, atrofiándolas e interfiriendo con su buen funcionamiento y para la parte aérea de la planta se puede apreciar amarillamiento, marchitez y crecimiento retardado (Torres, 2003).

3.3.1. Morfología de las hembras

En *Meloydogyne incognita* el cono del estilete está claramente curvado dorsalmente, la porción del cono es cilíndrica y la mitad posterior cónica, la columna es ligeramente más ancha en la base, los nódulos son anchos y planos, separados de la columna y con proyecciones hacia la parte anterior tan marcadas en algunos especímenes, que cada nódulo se ve como si fueran dos (Sasser, 1976).

3.3.2. Morfología de los machos

La forma de la cabeza de los machos de *Meloydogyne incognita* es muy característica, por lo que no se confunde fácilmente con ninguna otra especie, el disco labial es grande y redondeado, cóncavo centralmente y más alto que los labios medios, los cuales son tan anchos como la región cefálica que generalmente presenta 2 ó 3 anillos incompletos (Sasser, 1976).

3.3.3. Sintomatología

Las plantas infestadas por *Meloidogyne incognita*, muestran síntomas en los órganos aéreos similares a los producidos por enfermedades radiculares, disminuyendo el volumen de agua disponible para la planta; mostrando un desarrollo deficiente, menor cantidad de hojas pequeñas, amarillamiento, marchitamientos; los frutos y las inflorescencias se atrofian reduciendo la

producción (Agrios, 2005; Talavera, 2003). “La infección de las raíces produce engrosamientos característicos o agallas que pueden ser de varios tamaños dependiendo del número de hembras que albergue” (Talavera, 2003).

Las larvas se alimentan, en cierto grado, antes de penetrar, a expensas de las células epidérmicas de las raíces, pero una vez que se han establecido dentro de éstas, se convierten en parásitos sedentarios, incapaces de moverse, la alimentación se limita a las células que rodean su cabeza si la planta es un huésped adecuado, no evolucionan las células cercanas a la cabeza del parásito, hasta lo que, normalmente, hubieran sido xilema, floema y otros elementos de un cilindro central. Bajo la influencia del estímulo que provoca la secreción que inyectan por medio del estilete, se forman las llamadas “células gigantes”, éstas no son células sino masas de protoplasma, más o menos desnudas, de las que se alimentan los nemátodos, la formación de las células gigantes (Hiperplasia), por estímulo, no es el único efecto que producen los parásitos en los tejidos que los rodean, la proliferación e hipertrofia de las células corticales da por resultado la formación de las conocidas dilataciones o vesículas (Christie, 1974).

3.4. Control biológico

La primera evidencia del control biológico de nemátodos se presentó cuando se aplicó formaldehído al suelo para controlar enfermedades de raíces. Se vio el aumento del nemátodo del quiste de cereales, *Heterodera avenae*, debido a la supresión por el formaldehido de hongos que limitaban al nemátodo, lo que debemos tener primero en cuenta es el suelo supresivo, un suelo en el cual

los enemigos naturales se incrementan conforme los fitonemátodos, este suelo mantiene equilibrio entre fitonemátodos y los enemigos naturales que permite que el cultivo se pueda seguir cultivando a través de los años sin ver reducciones en el rendimiento. Además, proveen las condiciones que son favorables para la reproducción y acción de los enemigos naturales regulando la población de los fitonemátodos, por ejemplo: un suelo seco no presenta condiciones óptimas para el desarrollo de hongos y su efecto sobre las poblaciones de fitonemátodos es reducido (Cave, 1995).

3.5. Hongos endófitos

Fueron originalmente definidos como aquellos organismos no agresivos que viven dentro de los tejidos vegetales, pueden permanecer dentro de la planta sin hacerle daño, pero también son capaces de producir infecciones oportunistas cuando las plantas están bajo estrés; son encontrados tanto en plantas terrestres como acuáticas, en las zonas tropicales y templadas, presentan dos tipos de morfologías: una multicelular denominada filamentosa y otra unicelular denominada levaduriforme; los hongos filamentosos (miceliares o mohos), representan el crecimiento más típico de los hongos microscópicos (Gonzales, 2015).

3.5.1. Potencial antagonista de microorganismos endofíticos

Para considerar un microorganismo endofítico como agente potencial de biocontrol, no debe ser patógeno para plantas, hombres o animales, debe tener elevada capacidad de colonización y reproducción en los tejidos internos después de su inoculación en las plantas, ya que una población que

declina rápidamente tiene una baja capacidad competitiva con la microflora presente en la planta y puede que el microorganismo se vea reprimido fácilmente por los demás habitantes de esta; además, debe tener capacidad de reducir o suprimir eficientemente la población de nemátodos por debajo del nivel crítico; también es muy importante que tenga capacidad abundante de reproducción en condiciones in vitro para asegurar su reproducción y conservación a nivel comercial (Gonzales, 2015).

3.5.2. Descubrimiento e historia de los hongos endófitos

El término 'endófito' fue propuesto por (Bary, 1869), donde se formuló la hipótesis de que los cuadros toxicológicos observados en animales, se debían al consumo de semillas o partes aéreas de los pastos *Lolium temulentum*, L. *arvense*, L. *linicolum* y L. *remotum* (Poaceae) infectados con hongos Clavicipitáceos (Sanchez *et al.*, 2013).

(Funk, 1980), describió la resistencia al ataque de insectos en los pastos infectados con endófitos y (Clay, 1988) propuso que varios hongos endófitos (Clavicipitáceos) son mutualistas que defienden a la hospedera del ataque de herbívoros, posteriormente, varios investigadores de múltiples disciplinas como químicos, ecólogos, botánicos y micólogos se han dedicado al estudio de estos organismos, en la actualidad el interés por estos microorganismos ha aumentado enormemente debido a que son productores de metabolitos secundarios novedosos y con diversa actividad biológica (Sánchez *et al.*, 2013).

3.5.3. Clasificación de los hongos endófitos

Son un grupo muy diverso y polifilético que habitan en diversas partes de las plantas, la mayoría pertenecen al phylum Ascomycota, aunque también se han encontrado en los Basidiomycota, Zygomycota y Oomycota, históricamente los hongos endófitos se han clasificado en Clavicipitáceos y no Clavicipitáceos, basados en su filogenia e historia de vida. (Rodríguez, 2009) los clasifican tomando en cuenta su taxonomía, sus plantas hospederas, su evolución y sus funciones ecológicas (Sánchez *et al.*, 2013).

3.5.4. Relación hongo endófito-planta hospedera

Puede ir desde el mutualismo hasta la patogénesis, ambos organismos producen metabolitos secundarios potencialmente tóxicos; el hongo endófito produce factores de virulencia, como exoenzimas y metabolitos fitotóxicos, mientras que la planta produce defensas, tanto mecánicas como bioquímicas. (Sánchez *et al.*, 2013); para que ambos organismos coexistan se establece entre ellos una relación de antagonismo balanceado, que depende de la virulencia del hongo y de las defensas de la planta, que son influenciadas por los factores ambientales y por la etapa de desarrollo de ambos organismos., cuando los factores de virulencia del hongo y las defensas de la planta están en equilibrio se establece una relación endofítica y, cuando se presenta la senescencia del hospedero o se encuentra bajo estrés, el balance se torna a favor del hongo y éste se expresa como patógeno, presentándose los síntomas de enfermedad (Sánchez *et al.*, 2013).

3.5.5. Papel ecológico de los hongos endófitos

Usualmente toman nutrientes y protección de su hospedera, algunos pueden desempeñar un papel mutualista, que pueden beneficiar al inducir su crecimiento, al aumentar su tolerancia al estrés y al producir metabolitos secundarios con amplia diversidad estructural que le brindan protección y resistencia contra herbívoros y/o microorganismos fitopatógenos (Sánchez *et al.*, 2013).

Un hongo endófito puede producir metabolitos secundarios que inhiben a un patógeno o a otros hongos endófitos; sin embargo, puede no inhibir a otros organismos de su mismo entorno, inducen los efectos alelopáticos de su hospedera a través de la producción de metabolitos secundarios o aleloquímicos, es decir, influyen sobre el crecimiento y desarrollo de otras especies que crecen a su alrededor y usualmente son competidores por el espacio y nutrientes directos: por medio de enzimas y/o metabolitos secundarios con actividad anti-patógeno, producidos directamente por el hongo endófito que pueden ser indirectos: consisten en la inducción o incremento de la expresión de mecanismos de defensa químicos o fisiológicos intrínsecos a su planta hospedera y ecológicos: se llevan a cabo por ocupación del nicho ecológico, hiperparasitismo y predación (Sánchez *et al.*, 2013).

3.5.6. *Clonostachys* sp

Conidióforo erecto o sub erecto, elevándose desde el substrato o desde la hifa aérea, septado, hialino, ramificado en el ápice con tendencia penicilada,

esporogénesis al final de las células fiálides, fiálides agrupadas divergentes, en forma de botella, frecuentemente más convexo en un lado; fialosporas hialinas o pigmentada, no septada, ovoide o de vez en cuando aplanada en un lado, mucílago por debajo para formar cabezas globosas o sostenido junto en columnas dispersas (Lübeck, Knudsen, Jensen, Thrane, Janvier y Jensen, 2002).

Clonostachys sp pertenece al filo Ascomycota (Familia: Bionectriaceae) y su teleomorfo es *Bionectria ochroleuca*. (Schroers y Samuels, 1999); *Clonostachys* sp es un saprófito micoparásito cosmopolita que en ciertos hospederos puede permanecer por periodos prolongados dentro de sus tejidos (actuando como endófito) o creciendo epifíticamente (Hoopen, Rees, Aisa, Stirrup y Krauss. 2003).

Los cultivos de *Clonostachys* sp son de color blanco a salmón pálido, el micelio es de aspecto tomentoso a granuloso, como resultado de la formación de conidióforos con masas de conidias, los que siempre son más abundantes en el centro que en los márgenes de la colonia (Piontelli y Giusiano, 2003). Los conidióforos se presentan en micelio aéreo existiendo dos tipos de conidióforos: verticilados y penicilados, siendo estos últimos los que producen la mayor cantidad de conidias (Sutton, Li, Peng, Yu, Zhang y Valdebenito-Sanhueza, 1997); los conidióforos verticilados son los primeros en formarse con fiálides largas y divergentes; y los conidióforos secundarios o penicilados, son de aspecto bi o terverticilados, con ramas y fiálides adpresas o convergentes de menor tamaño que los verticilados, las conidias de

Clonostachys sp son hialinas, lisas, ligeramente curvadas con un lado un poco aplanado, formando masas viscosas sobre los conidióforos, generalmente miden entre 4,2 – 6,5 x 2,1- 3,3 µm (Piontelli y Giusiano, 2003, Schroers, Samuels, Seifer y Gams 1999).

Los mecanismos de acción de las cepas de *Clonostachys* sp, no han sido completamente estudiados, pero se cree que juegan un rol importante en la competencia por sustrato, micoparasitismo, antibiosis y resistencia sistémica inducida (Sutton *et al.*, 1997), el mecanismo de antagonismo por competencia es la interacción entre microorganismos referida a la competencia que se establece entre ellos (antagonista y patógeno) por nutrientes, energía, espacio, etc. (Bettiol, 1991); la interacción basada en la competencia por sustrato no es patógeno-específica y el grado de supresión de la enfermedad alcanzado depende de varios factores bióticos (hospedero y estatus nutricional) y abióticos (temperatura y humedad relativa) y su eficacia no puede ser predecida con exactitud (Guetsky, Shtienberg, Elad, Fischer y Dinoor, 2002).

Se ha comprobado in vitro la versatilidad de las cepas de *Clonostachys* sp para crecer y esporular en diferentes nichos como raíces, semillas, suelo, hipocotíleos, hojas, flores, etc., protegiéndolos del ataque de patógenos, siendo este un mecanismo de importancia en la supresión de *Botrytis cinerea* en varios hospederos (Lübeck *et al.* 2002, Sutton *et al.*, 1997, Yu y Sutton, 1997).

Distintas especies de *Clonostachys* sp son capaces de producir una gran cantidad de metabolitos tóxicos y antibióticos que podrían estar involucradas en este mecanismo de antagonismo (Okuda, Kohno, Kishi, Asai, Nishio y Komatsubara. 2000); dentro de los metabolitos descritos para *Clonostachys* sp, destaca la producción de cuatro tipos de glisopreninas y una mezcla de péptidos pertenecientes a la familia de los peptaibioticos, las glisopreninas interfieren con la formación de apresorio de *Magnaporthe grisea* y los peptaibols son capaces de interrumpir el crecimiento de colonias, lisis y melanización de hifas de *S. sclerotiorum*, además de que este tipo de compuestos estarían asociados a respuestas de defensa en las plantas contra patógenos (Rodríguez, Cabrera, Gozzo, Eberlin y Godeas, 2011).

3.6. Antecedentes de investigación con hongos endófitos

El efecto antagónico de *Clonostachys rosea* sobre *Botrytis cinerea*, hongo patógeno de frutos de *Vitis vinífera*, entre enero a noviembre del 2013, se observó que todas las colonias de *Clonostachys rosea* mostraron alta capacidad antagónica, concluyendo que *Clonostachys rosea* presenta un efectivo efecto antagónico sobre *Botrytis cinerea* (Rodríguez y Chico, 2013)

Así mismo estudió el antagonismo de cuatro aislamientos brasileños de *Clonostachys rosea*, en plantas de tomate, margarita, soja, eucalipto, petunia y alyssum de violeta, teniendo promoción de crecimiento, con el aumento de la altura, el aislamiento NCR61 / F destacaba, porque reducía la época de la emergencia en margarita, es importante aclarar los mecanismos de ascenso

de crecimiento y valorar la aplicación de *C. rosea* en las condiciones de la producción comercial de plantas (Zaldúa, 2012).

Las medidas alternativas de control usando hongos filamentosos, bacterias y levaduras, tanto *in vitro* como en campo, especies de *Trichoderma* sp y *Clonostachys* sp destacándose en este último género *Clonostachys rosea*, investigaciones previas del Laboratorio de Patología Forestal de la Universidad de Concepción permitieron obtener dos cepas de *Clonostachys rosea* con un gran potencial como ACB (Agente de Control Biológico) frente a *Botrytis cinerea* en viveros de *E. globulus*, determinando aspectos ecológicos de las cepas de *C. rosea*, UDC-A10 y UDC-A11, su efecto sobre *Botrytis cinerea* y el hospedero, mecanismos de antagonismo y el control del patógeno en mini-estacas y plántulas de *E. globulus*, concluyendo que las cepas de *C. rosea*, UDC-A10 y UDC-A11, poseen varios mecanismos de antagonismo e inhiben a *B. cinérea*, demostrando versatilidad bajo diferentes condiciones de cultivo *in vitro* y controlan eficazmente la enfermedad que ocasiona *B. cinerea* en mini-estacas y plántulas de *E. globulus* sin causar alteraciones fisiológicas en el hospedero (Zaldúa, 2012).

Morandi, Sutton y Maffia. 2000, estudiaron *Clonostachys rosea*, determinando que el hongo puede ser encontrado en regiones diferentes, colonizando muchas especies de verdura, respecto al control biológico, *Clonostachys rosea* ha demostrado ser eficaz contra agentes patógenos. Además, informan que trabaja como antagonista actuando como promotor de crecimiento.

IV. MATERIALES Y METODOLOGÍA

4.1. Materiales

4.1.1. Ubicación del trabajo de investigación

El trabajo de investigación se desarrolló en el Laboratorio de Bioprotección del Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana (IIAP-San Martín). Ubicado en el distrito de Morales, provincia y departamento de San Martín, que se encuentra a una Latitud sur: 06° 36' 15", longitud oeste: 76° 10' 30", altitud es de 283 m.s.n.m.n. En dos fases, fase de vivero y laboratorio.

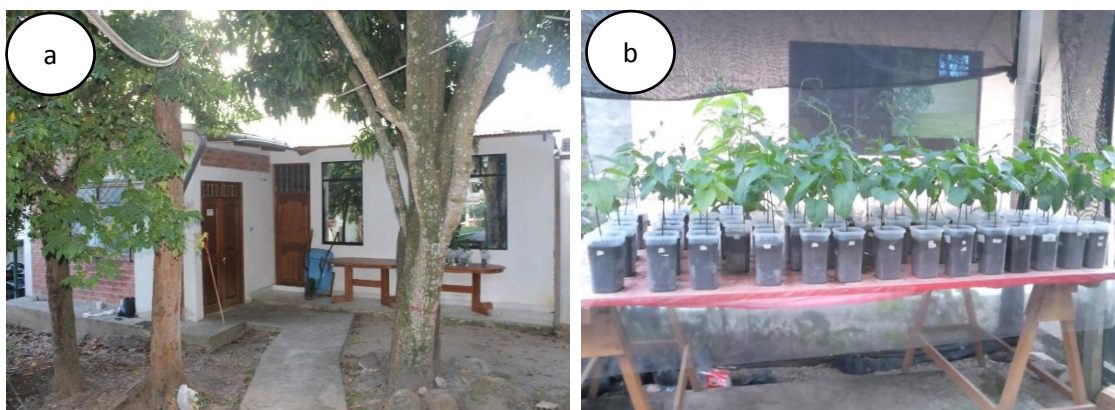


Figura 1: Instalaciones del Laboratorio de Bioprotección y del vivero ubicada en el Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana (IIAP-San Martín). a) Laboratorio de Bioprotección. b) Plantas de sachá inchi en desarrollo en el vivero.

4.1.2. Ecotipos utilizados

Se utilizaron semillas de sachá inchi de la accesión Shica, que fue suministrada por el Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana (IIAP-SM).



Figura 2: Semillas de sachá inchi, accesión Shica.

4.1.3. Aislamientos de *Clonostachys* sp, endófito de sachá inchi

Se estudió 15 cepas de *Clonostachys* sp estas cepas fueron colectadas de plantas de seis especies de *Plukenetia* sp (Cuadro 1). Las cepas fueron facilitadas por la Micoteca del laboratorio de Bioprotección del IIAP-San Martín.

Cuadro 1: Tratamiento en estudio, Cepas del hongo endófito *Clonostachys* sp:

Tratamiento	Género	Aislamiento	Procedencia	
			Especie	Órgano
T1	<i>Clonostachys</i> sp	kmd 66	<i>Plukenetia huayllabambana</i>	Hoja
T2	<i>Clonostachys</i> sp	kmd 70	<i>Plukenetia</i> sp	Hoja
T3	<i>Clonostachys</i> sp	kmd 71	<i>Plukenetia brachybotria</i>	Hoja
T4	<i>Clonostachys</i> sp	kmd 74	<i>Plukenetia carolis-vegae</i>	Hoja
T5	<i>Clonostachys</i> sp	kmd 75	<i>Plukenetia</i> sp	Tallo
T6	<i>Clonostachys</i> sp	kmd 81	<i>Plukenetia huayllabambana</i>	Tallo
T7	<i>Clonostachys</i> sp	kmd 83	<i>Plukenetia carolis-vegae</i>	Tallo
T8	<i>Clonostachys</i> sp	kmd 85	<i>Plukenetia lorentensis</i>	Hoja
T9	<i>Clonostachys</i> sp	kmd 86	<i>Plukenetia</i> sp	Hoja
T10	<i>Clonostachys</i> sp	kmd 89	<i>Plukenetia lorentensis</i>	Tallo
T11	<i>Clonostachys</i> sp	kmd 90	<i>Plukenetia carolis-vegae</i>	Hoja
T12	<i>Clonostachys</i> sp	kmd 100	<i>Plukenetia huayllabambana</i>	Hoja
T13	<i>Clonostachys</i> sp	kmd 101	<i>Plukenetia</i> sp	Tallo
T14	<i>Clonostachys</i> sp	kmd 127	<i>Plukenetia brachybotria</i>	Hoja
T15	<i>Clonostachys</i> sp	kmd 158	<i>Plukenetia brachybotria</i>	Tallo

4.2. Metodología

4.2.1. Incremento de inóculo de *Clonostachys* sp.

4.2.1.1. Preparación de medio de cultivo

- **Papa Sacarosa Agar (PSA):** Se preparó PSA, medio óptimo para el desarrollo de las cepas indicadas en el cuadro 3, para un litro de medio se lavó 250 g de papa blanca variedad canchán, estas en trozos se pusieron a cocer en 500 ml de agua destilada (AD) durante 10 minutos aproximadamente evitando que deshaga, después el caldo de papa se filtró en otro recipiente limpio y se agregó 1 mg de sacarosa (azúcar rubia). En otro recipiente que contiene 500 ml de AD se diluyó 18 g de agar en tiras con ayuda de un horno microondas. Ambas diluciones fueron mezcladas y agitadas unos minutos. La mezcla antes que solidifique, se distribuyó en matraces de 200ml, después cada matraz con el medio fue cerrado con un tapón de algodón y cubierto con papel aluminio, para luego esterilizar a 121°C de temperatura, 15 libras de presión y por espacio de 20 minutos con ayuda de una autoclave vertical a vapor.

Al matraz que contiene el medio de cultivo estéril y tibio (temperatura 25°C aproximadamente) se agregó 10 mg de antibiótico Oxitetraciclina, inmediatamente después el medio de cultivo fue distribuido en placas de Petri 15 x 60 mm.

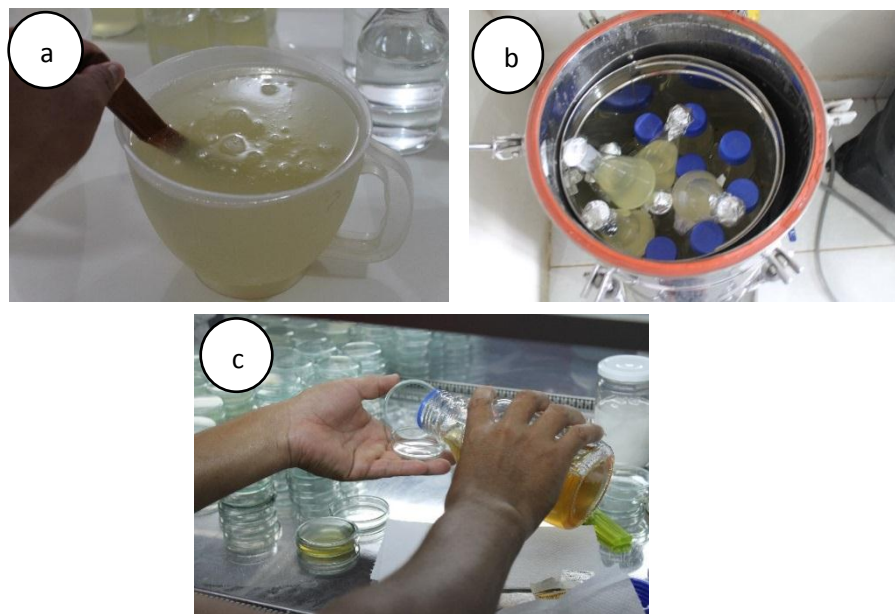


Figura 3: Preparación de medio (PSA). a) Caldo de papa + dilución de agar. b) Esterilización de medio PSA en una autoclave digital. c) Plaqueo de medio PSA en placas de Petri 15 x 60 mm.

4.2.1.2. Reactivación de cepas e incremento de inóculo

Las cepas de *Clonostachys* sp, que se encuentran conservadas en la Micoteca del IIAP – San Martín, fueron reactivadas en placas de Petri de 15 x 60 mm que contiene medio Papa Sacarosa Agar + Oxitetraciclina (PSAO). Para ello se extrajo una porción de agar con el micelio del hongo de los viales y se transfirió a las placas en condiciones asépticas. Las placas se dejaron en incubación a temperatura ambiente por cinco días. Después las cepas reactivadas fueron transferidas a otra placa conteniendo el mismo medio para las pruebas de este estudio y una copia fue conservada en viales que contienen solución Glicerol al 20% y a -20°C de temperatura.

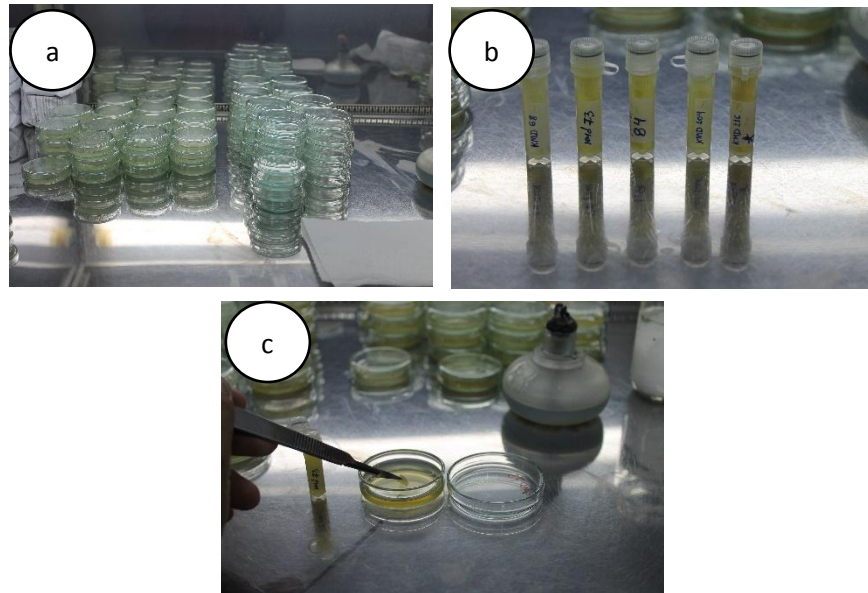


Figura 4: Reactivación e incremento de inóculo de cepas de *Clonostachys* sp.

a) Placas de Petri de 15 x 60 mm conteniendo medio PSA + O. b) Viales de *Clonostachys* sp. c) Repique de cepas en medio PSA + O.

4.2.2. Capacidad endofítica de *Clonostachys* sp, colectada de plántulas de *Plukenetia volubilis*.

4.2.2.1. Producción de plántulas de sachá inchi

a. Pre-germinado de semillas

Para este estudio se usaron semillas de sachá inchi de la accesión Shica recién cosechada (cinco días antes del pre-germinado). A las semillas se le eliminó la testa manualmente después se desinfestó con solución de lejía al 20% durante dos minutos, para luego enjuagar tres veces con agua destilada estéril (ADE) con la finalidad de eliminar restos de legía. En condiciones asépticas las semillas desinfestadas se transfirieron a una bandeja desinfestada que contenía una capa de algodón estéril, después la bandeja fue puesta

a temperatura ambiente durante cinco días, periodo en que se visualizó la radícula que permitió su posterior siembra en macetas conteniendo sustrato estéril.



Figura 5: Pre – germinado de semillas de sacha inchi. a) Semillas accesión Shica. b) Bandeja conteniendo semillas de sacha inchi desinfestadas. c) Presencia de radícula en semillas de sacha inchi después de cinco días de haber sido puestas en incubación.

4.2.2.2. Preparación de sustrato

Se usó como sustrato tierra agrícola, ésta fue incorporada a bolsas de polipropileno de 10 x 15 cm de 2 kg por bolsa. Después se esterilizó a 121°C de temperatura, 15 libras de presión en dos tiempos (30 minutos por tiempo). Después el sustrato estéril fue transferido a macetas previamente desinfestadas con solución de lejía al 20% por cinco minutos y enjuagadas tres veces con agua destilada estéril.

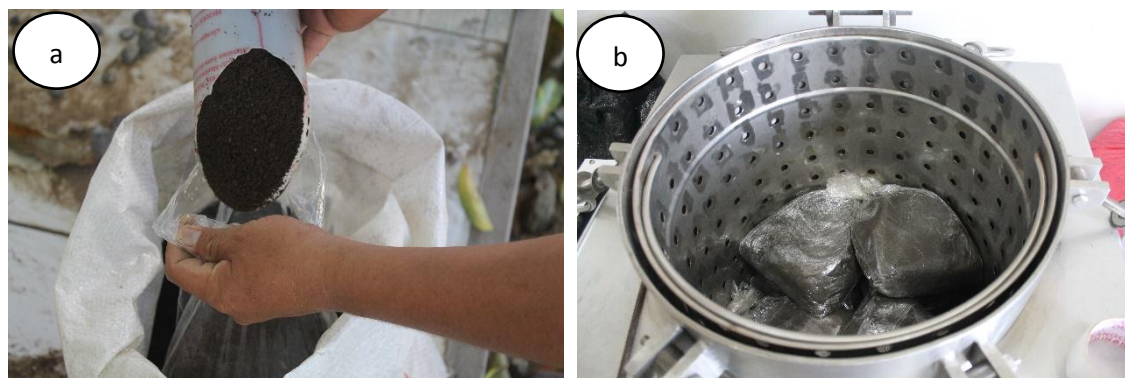


Figura 6: Preparación de sustrato. a) Tierra agrícola puesta en bolsas de polipropileno de 10 x 15 cm. b) Esterilización de suelo en una autoclave digital.

4.2.2.3. Colonización de *Clonostachys* sp

a. Colonización de sustrato

Previamente, a la placa con el hongo desarrollado se incorporó 10ml de ADE y con una bagueta estéril se removió la superficie del medio, con la finalidad de liberar las conidias del micelio, después la suspensión de conidias fue diluida en 40 ml de ADE en un vaso de prueba. Luego del vaso se tomó una alícuota de 1ml para cuantificar la concentración de conidias por centímetro cubico (cc) de agua con ayuda de un hematocimetro. Con una pipeta se inoculó la suspensión de conidias al sustrato a una concentración de 1×10^6 ufc/cc. Después cada maceta con sustrato inoculado con el hongo fue incubado a temperatura ambiente por 7 días.

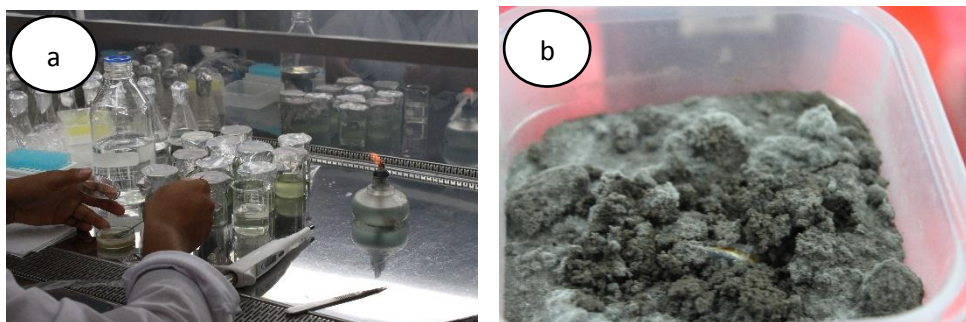


Figura 7: Colonización de sustrato con cepas de *Clonostachys* sp a) Producción de fuente de inóculo de cepas de *Clonostachys* sp b) Suelo colonizado.

b. Siembra de semillas de sachá inchi

Las semillas pre-germinadas fueron sembradas al sustrato colonizado con *Clonostachys* sp, orientando la radícula hacia abajo, haciendo un orificio con ayuda de una bagueta estéril para luego cubrir con una ligera capa de sustrato, posteriormente se incorporó 50ml de ADE. Las macetas fueron puestas en incubación hasta que la plántula alcance dos pares de hoja.



Figura 8: Siembra de semillas de sachá inchi en suelo colonizado con cepas de *Clonostachys* sp orientando la radícula hacia abajo.

4.2.2.4. Evaluación de la capacidad endofítica de *Clonostachys* sp, colectadas de plántulas de *Plukenetia volubilis*.

Las plantas de sachá inchi que crecieron en sustrato colonizado con *Clonostachys* sp, una vez alcanzadas 45 días de edad, fueron sacrificadas para el re-aislamiento del hongo, de cada planta se extrajo una sección del tallo principal, esta se desinfectó en solución de lejía al 20% por un minuto, luego se lavó con ADE cuatro veces hasta quitar residuos de la lejía. Se realizó cortes para extraer discos pequeños sobre papel toalla y se dejó sobre la misma para su secado. Los discos de tallo fueron sembrados en placas conteniendo medio PSAO. Estas placas fueron incubadas a temperatura ambiente por cinco días. Al término del periodo de incubación se registró como positivo (+) cuando se observa crecimiento del hongo de los discos y como negativo (-) cuando no se observa crecimiento alguno. En cada placa se puso 10 discos y esta cantidad se consideró como el 100% para la colonización de *Clonostachys* sp teniendo tres repeticiones (plantas) por cada aislamiento del hongo endófito.

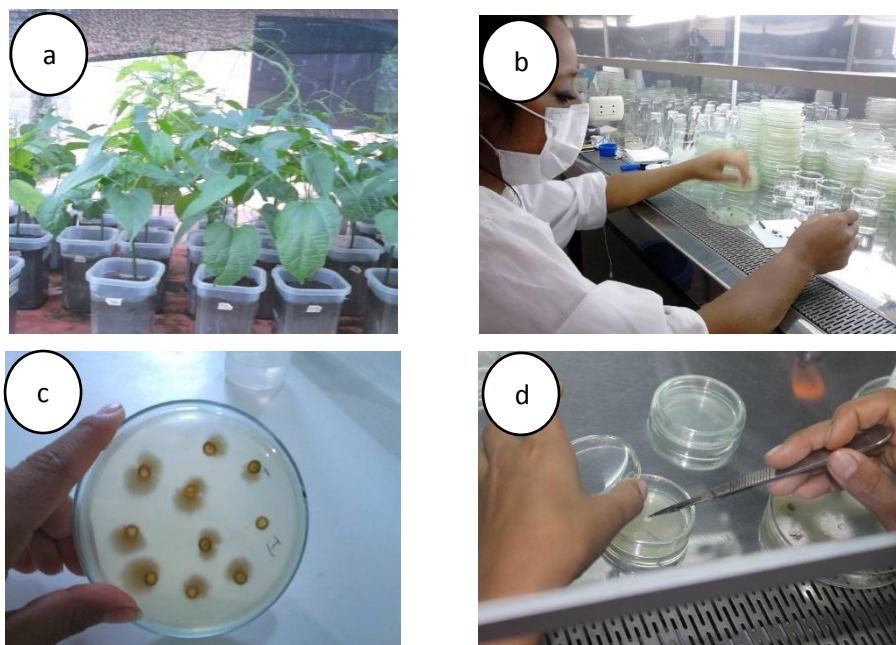


Figura 9: Evaluación de la capacidad endofítica de cepas de *Clonostachys* sp hacia plantas de sachá inchi. a) Plantas de sachá inchi de aproximadamente 45 d.d.s. b) Proceso de corte, desinfección y siembra de discos de tallo en placas de Petri. c) Discos en placa de Petri en desarrollo. d) Re - aislamiento en placas de Petri de 15 x 60mm.

4.2.3. Evaluar la influencia del hongo endófito *Clonostachys* sp, como promotor de crecimiento de plántulas de *Plukenetia volubilis*

4.2.3.1. Crecimiento de plantas colonizadas con *Clonostachys* sp.

Las plantas de sachá inchi que crecieron en sustrato colonizado con *Clonostachys* sp, descritas en el párrafo 4.2.2.3 se mantuvieron en un ambiente de incubación (± 2) 25 °C durante 30 días, posteriormente se trasladó a un vivero, donde se registró los parámetros biométricos (área foliar, altura de planta y número de hojas) con intervalos de tres días hasta los 60 días de edad, al término de este periodo tres plantas por

cada tratamiento se sacrificaron para medir la longitud de raíz con ayuda del programa Image Analysis Software for Plant Disease Quantification (ASSESS) y biomasa de la plántula.

a. Área foliar (AF)

Para esta evaluación se foto documentó hojas de plantas de sachá inchi en cada evaluación se tomó tres fotografías de plantas de sachá inchi representativos por cada tratamiento. El cálculo del área foliar se realizó con la ayuda del programa Image Analysis Software for Plant Disease Quantification (ASSESS).

b. Peso seco de la biomasa aérea

Se tomó tres plantas previamente sacrificadas, etiquetadas y lavadas, se cortó en dos partes separando la parte aérea de la parte radicular por cada planta, del cual se obtuvo un peso fresco, posteriormente se puso a secar en una estufa a una temperatura de 60°C, por un periodo de 24 horas, para luego realizar los pesos respectivos tanto de la parte aérea como de la radicular con la ayuda de una balanza analítica (OHAUS).

4.2.4. Determinar la acción biológica del hongo endófito *Clonostachys* sp sobre *Meloidogyne incognita* en *Plukenetia volubilis*.

4.2.4.1. Obtención de plántulas

Las plantas de sachá inchi fueron producidas y colonizadas con *Clonostachys* sp, siguiendo el procedimiento descrito en los párrafos 4.2.2.1 y 4.2.2.3.

4.2.4.2. Infestación de plántulas sachá inchi con *Meloidogyne incognita*

Se colectaron raíces de tomate (*Lycopersicon esculentum* L.), por ser fácil su propagación y ser susceptible al ataque de *Meloidogyne incognita*. Las raíces se lavaron con agua de caño, cortando aquellas que tengan nódulos en trozos de aproximadamente 2 cm de longitud, posteriormente se licuó durante tres minutos en un litro de agua. El extracto licuado se tamizó y lavó con abundante agua. Se utilizaron tamices de 170, 230 y 400 mesh. Los huevos y juveniles (J2) del nemátodo atrapados en el tamiz de 400 mesh se colectaron con ayuda de una pizeta y se transfirió a un vaso de prueba de 500 ml. El inóculo se cuantificó con ayuda de un microscopio, tomando para ello una alícuota de 3 ml de la suspensión, transfiriéndola a una placa de conteo, expresando el resultado en número de huevos por centímetro cúbico (huevos/cm³). Los huevos del nemátodo se inocularon a una concentración de 500 huevos por maceta con 2 kg de sustrato. Para la infestación de las raíces de sachá inchi con *Meloidogyne incognita* se removió el suelo aproximadamente 5 cm alrededor del tallo y 2 cm de profundidad. Los huevos de *Meloidogyne incognita* se inocularon con ayuda de una jeringa hipodérmica de 10 ml (Márquez *et al*, 2010). Posteriormente las plantas se incubaron a temperatura ambiente del

invernadero y con humedad a capacidad de campo constante por un periodo de 45 días considerado el ciclo biológico del nemátodo (25 a 35 días), durante esta etapa de crecimiento de plantas se evaluó la altura a los cinco días después de la infestación con un intervalo de cinco días durante 45 días.

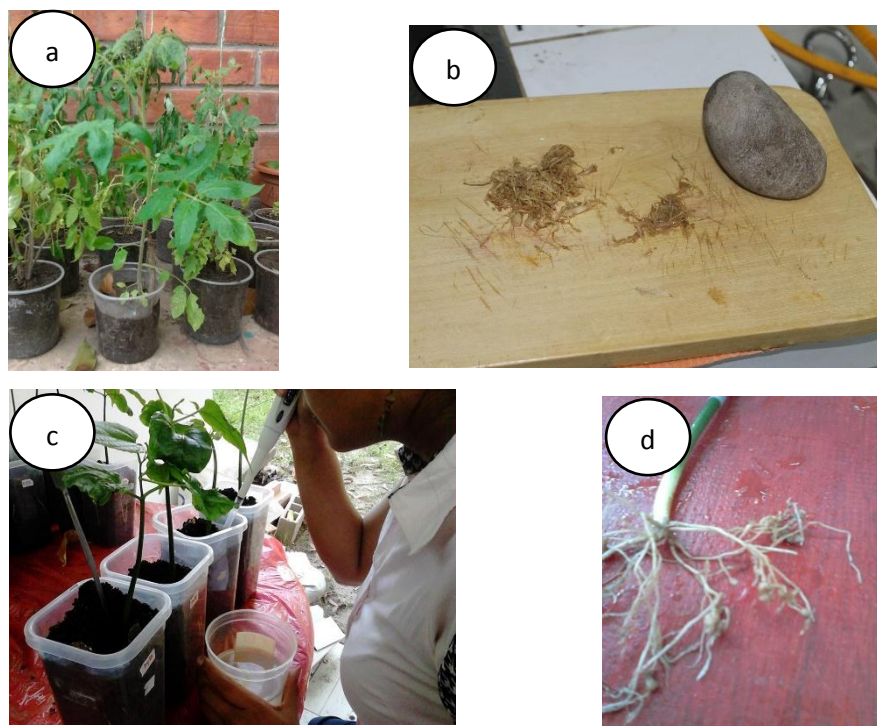


Figura 10: Infestación de plantas de sacha inchi con *Meloidogyne incognita*.

a) Fuente de inóculo (plantas de tomate). b) Proceso de extracción de nemátodos. c) Inoculación con huevos de *Meloidogyne incognita* a sachá inchi. d) Raíz de sachá inchi con presencia de nódulos de nemátodos.

4.2.4.3. Cuantificación de nódulos

Al término del periodo de incubación las plantas de sachá inchi se sacrificaron cuidadosamente, separando la parte aérea de la parte radicular, lavando posteriormente con agua de caño de forma individual

(Márquez *et al.*, 2007). Inmediatamente después se cuantificó el número de nódulos por sistema radicular y la longitud de la raíz se determinó a través del programa Image Analysis Software for Plant Disease Quantification (ASSESS).

4.2.4.4. Análisis de datos

Los datos se registraron y analizaron con los datos de longitud de raíz y número de nódulos transformados a arco seno se realizaron los análisis de varianza (ANVA) y las medias fueron comparadas usando la prueba de Duncan ($P=0,05$) con la ayuda del programa estadístico Infostat/Profesional Versión 1.1.

4.2.5. Capacidad del hongo endófito *Clonostachys* sp de inducir tolerancia en plantas de *Plukenetia volubilis* al estrés hídrico

Las plantas de sachá inchi fueron colonizadas con *Clonostachys* sp, siguiendo los procedimientos descritos en los párrafos 4.2.2.1 y 4.2.2.3. Previamente se realizó una poda a 20 cm de la base de cada planta de sachá inchi, para facilitar las evaluaciones. Se sometió a estrés hídrico a plantas de sachá inchi de 60 días de edad. Para esta prueba, se consideró 15 plantas por cada tratamiento más dos controles, con y sin estrés hídrico (15 plantas por cada uno). Las evaluaciones se realizaron a diario, detectando la presencia de plantas marchitadas, si es que había presencia de estrés se aplicaba 80 ml de agua destilada (AD) a cada tratamiento, excepto al control sin estrés, esperando ver la reacción en las próximas 24 horas, las plantas sobrevivientes al estrés se identificaban y se dejaba para la siguiente fecha,

pero las plantas muertas se tomaba fotos y se pesaba la parte aérea y radicular en una balanza analítica. Se realizó el mismo procedimiento en las siguientes fechas de evaluación evaluando peso fresco, porcentaje de agua y longitud de raíz medida a través del programa Image Analysis Software for Plant Disease Quantification (ASSESS).



Figura 11: Plantas de sachá inchi inoculadas con cepas de *Clonostachys* sp inducidas a estrés hídrico. a) Plantas de sachá inchi sometidas a estrés hídrico. c) Planta de sachá inchi seca.

4.2.6. Diseño experimental

Los tratamientos estuvieron distribuidos en un diseño experimental completamente al azar (DCA). Con dieciséis tratamientos y tres repeticiones para cada objetivo específico. Cada planta de sachá inchi representó una unidad experimental, lo que dio un total de 48 plantas para los objetivos. En condiciones de laboratorio y vivero.

Cuadro 2: Tratamientos estudiados

Tratamiento	Género	Aislamiento
T0	Control	C
T1	<i>Clonostachys</i> sp	kmd 66
T2	<i>Clonostachys</i> sp	kmd 70
T3	<i>Clonostachys</i> sp	kmd 71
T4	<i>Clonostachys</i> sp	kmd 74
T5	<i>Clonostachys</i> sp	kmd 75
T6	<i>Clonostachys</i> sp	kmd 81
T7	<i>Clonostachys</i> sp	kmd 83
T8	<i>Clonostachys</i> sp	kmd 85
T9	<i>Clonostachys</i> sp	kmd 86
T10	<i>Clonostachys</i> sp	kmd 89
T11	<i>Clonostachys</i> sp	kmd 90
T12	<i>Clonostachys</i> sp	kmd 100
T13	<i>Clonostachys</i> sp	kmd 101
T14	<i>Clonostachys</i> sp	kmd 127
T15	<i>Clonostachys</i> sp	kmd 158

Parámetros de evaluación:

Porcentaje de colonización (%C) - Bailey, et al.2008

Altura de planta, número de hojas.

Peso fresco y seco de la biomasa.

Porcentaje de agua (%A) - Azcón y Talón, 2000.

$$\%A = \frac{Pf - Ps}{Pf} \times 100$$

Cuantificación de nódulos

Área foliar – Programa “ASSES”

Longitud de raíz (LR) – Programa “ASSES”

V. RESULTADOS Y DISCUSIONES

5.1. Resultados

5.1.1. Capacidad endofítica de *Clonostachys* sp colectadas de plántulas de *Plukenetia volubilis*.

a. Capacidad endofítica de *Clonostachys* sp.

En la tabla de análisis de Varianza para la capacidad endofítica de cepas de *Clonostachys* sp endófito de plantas de sachá inchi, muestra efecto altamente significativo ^(**) en los tratamientos evaluados ($p < 0.05$). Datos transformados "ASeno ($x/100$)", muestra en el (Cuadro 3).

Cuadro 3: Análisis de varianza de la capacidad endofítica de cepas de *Clonostachys* sp endófitos en plantas de sachá inchi (*Plukenetia volubilis*).

Fuente de variación	S.C	G.L	C.M	F. calculado	p-valor	Significancia
TRATAMIENTOS	19524,8	15	1301,7	152,96	<0,0001	**
Error	255,29	30	8,51			
Total	19812,56	47				

**= Altamente significativo

$$R^2 = 99\%$$

$$CV = 7,27\%$$

$$\bar{X} = 42,49\%$$

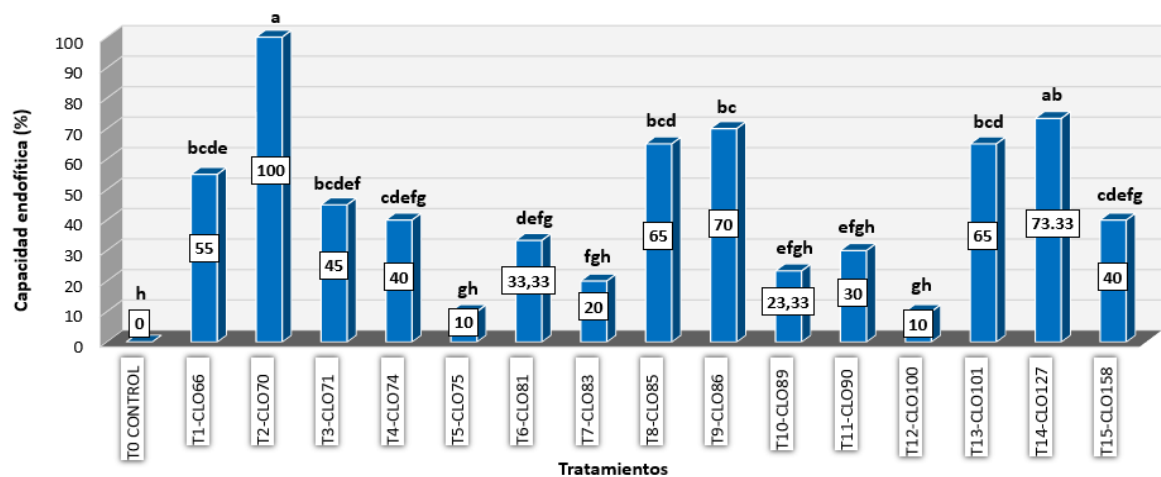


Figura 12: Prueba de Duncan ($p < 0,05$) para el porcentaje (%) de colonización de *Clonostachys* sp, endófito de sachá inchi (*Plukenetia volubilis*) en placas conteniendo medio PSAO (papa sacarosa agar más oxitetraciclina). Las medias con letras diferentes indican estadísticamente diferencias significativas ($p < 0,05$).

5.1.2. Influencia del hongo endófito *Clonostachys* sp, como promotor de crecimiento de plantas de sachá inchi

a. Altura de plantas de sachá inchi colonizadas con *Clonostachys* sp.

En la tabla de análisis de Varianza para la altura de plantas colonizadas con cepas de *Clonostachys* sp, endófito de sachá inchi, muestra efecto altamente significativo ^(**) en los tratamientos evaluados ($p < 0,05$). (Cuadro 4).

Cuadro 4: Análisis de varianza de la altura de plantas de sachá inchi colonizadas con cepas de *Clonostachys* sp.

Fuente de variación	S.C	G.L	C.M	F. calculado	p-valor	Significancia
TRATAMIENTOS	11,79	15	0,79	5,71	<0,0001	**
Error	4,13	30	0,14			
Total	15,99	47				

**= Altamente Significativo

$R^2 = 74\%$

CV= 9,26%

$\bar{X} = 16,39$ cm

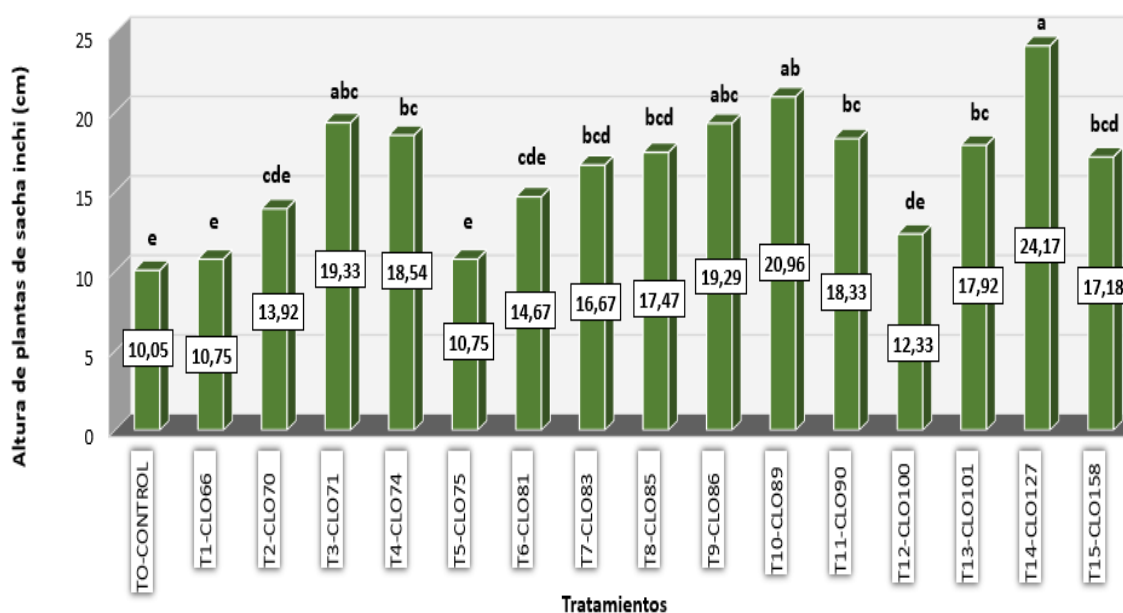


Figura 13: Prueba de Duncan ($p < 0,05$) para la altura de plantas colonizadas con cepas de *Clonostachys* sp, endófito de sachá inchi. Las medias con letras diferentes indican estadísticamente diferencias significativas ($p < 0,05$).

b. Área foliar de plantas de sachá inchi colonizados con *Clonostachys* sp.

En la tabla de análisis de Varianza para determinar el área foliar de plantas de sachá inchi, muestra efecto altamente significativo ^(**) en los tratamientos evaluados ($p < 0,05$) (Cuadro 5).

Cuadro 5: Análisis de varianza del área foliar de plantas de sachá inchi colonizadas con cepas de *Clonostachys* sp.

Fuente de variación	S.C	G.L	C.M	F. calculado	p-valor	Significancia
TRATAMIENTOS	30,48	15	2,03	10,71	<0,0001	**
Error	5,69	30	0,19			
Total	36,74	47				

**= Altamente Significativo

$$R^2 = 85\%$$

$$CV = 5,99\%$$

$$\bar{X} = 53,63 \text{ cm}^2$$

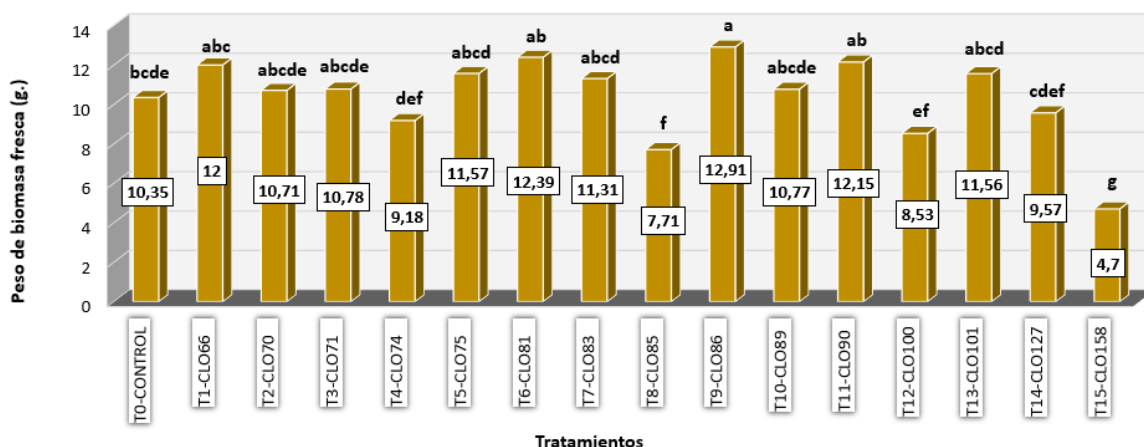


Figura 14: Prueba de Duncan ($p < 0,05$) para el área foliar de plantas colonizadas con cepas de *Clonostachys* sp, endófito de sachá inchi. Las medias con letras diferentes indican estadísticamente diferencias significativas ($p < 0,05$).

c. Número de hojas por planta de sachá inchi colonizados con *Clonostachys* sp.

En la tabla de análisis de Varianza para el número de hojas por planta de sachá inchi, muestra efecto altamente significativo (**) en los tratamientos evaluados ($p < 0,05$), (Cuadro 6).

Cuadro 6: Análisis de varianza del número de hojas por planta de sachá inchi colonizadas con cepas de *Clonostachys* sp. Datos transformados a \sqrt{x} .

Fuente de variación	S.C	G.L	C.M	F. calculado	p-valor	Significancia
TRATAMIENTOS	193,15	15	12,88	6,3	<0,0001	**
Error	61,29	30	2,04			
Total	254,48	47				

**= Altamente Significativo

$R^2 = 76\%$ $CV = 8,04\%$ $\bar{X} = 18$ hojas

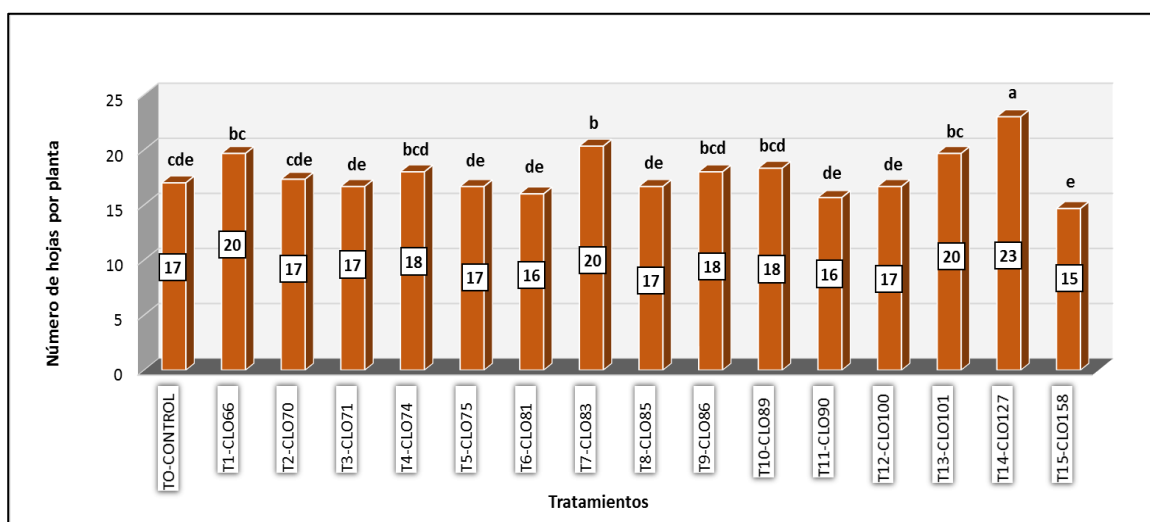


Figura 15: Prueba de Duncan ($p < 0,05$) para el número de hojas por planta de sachá inchi colonizada con cepas de *Clonostachys* sp. Las medias con letras diferentes indican estadísticamente diferencias significativas ($p < 0,05$).

d. Peso de biomasa fresca total de plantas de sachá inchi colonizados con *Clonostachys* sp.

En la tabla de análisis de Varianza para el peso de biomasa fresca total de plantas de sachá inchi, muestra efecto altamente significativo (**) en los tratamientos evaluados ($p < 0,05$), (Cuadro 7).

Cuadro 7: Análisis de varianza del peso de biomasa fresca total de plantas de sachá inchi colonizadas con cepas de *Clonostachys* sp.

Fuente de variación	S.C	G.L	C.M	F. calculado	p-valor	Significancia
TRATAMIENTOS	5,77	15	0,38	9,41	<0,0001	**
Error	1,23	30	0,04			
Total	7,06	47				

**= Altamente Significativo

$$R^2 = 83\%$$

$$CV = 6,32\%$$

$$\bar{X} = 10,4 \text{ g}$$

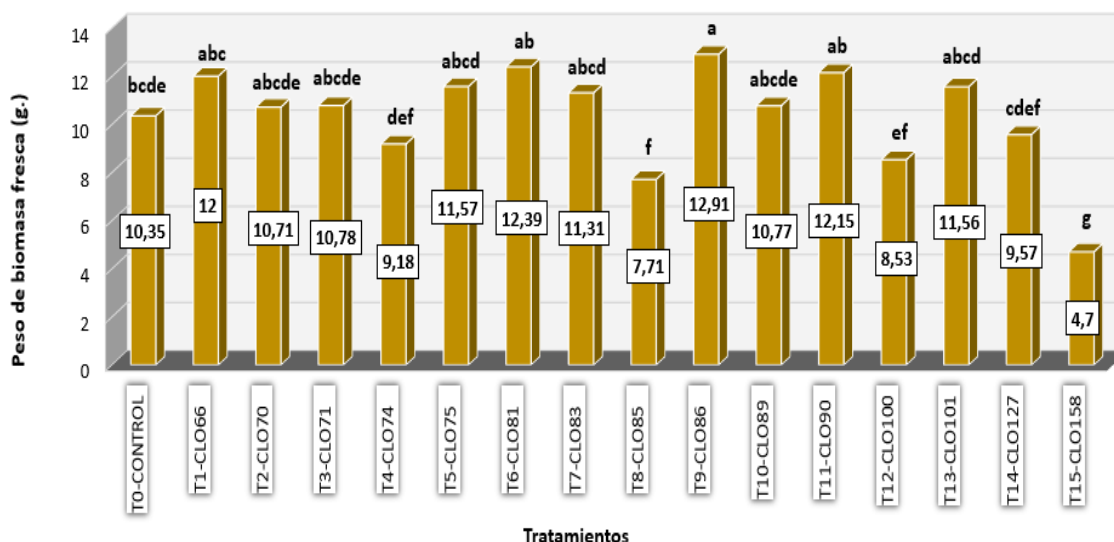


Figura 16: Prueba de Duncan ($p < 0,05$) para el peso de biomasa fresca total de plantas de sachá inchi colonizadas con cepas de *Clonostachys* sp. Las medias con letras diferentes indican estadísticamente diferencias significativas ($p < 0,05$).

e. Longitud de raíces de plantas de sachá inchi colonizadas con *Clonostachys* sp.

En la tabla de análisis de Varianza para la longitud de raíces de plantas de sachá inchi, muestra efecto altamente significativo ^(**) en los tratamientos evaluados ($p < 0,05$), (Cuadro 8).

Cuadro 8: Análisis de varianza para la longitud de raíces de plantas de sachá inchi colonizadas con cepas de *Clonostachys* sp.

Fuente de variación	S.C	G.L	C.M	F. calculado	p-valor	Significancia
TRATAMIENTOS	270,14	15	18,01	5,66	<0,0001	**
Error	95,53	30	3,18			
Total	368,9	47				

*= Significativo

$$R^2 = 74\%$$

$$CV = 9,42\%$$

$$\bar{X} = 18,94 \text{ cm}$$

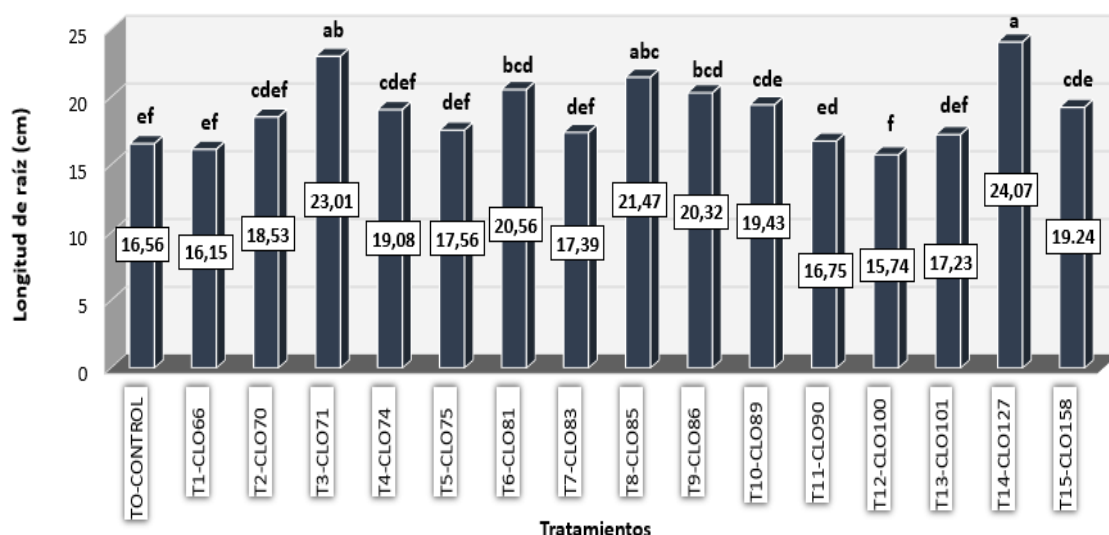


Figura 17: Prueba de Duncan ($p < 0,05$) para la longitud de raíces de plantas de sachá inchi colonizadas con cepas de *Clonostachys* sp. Las medias con letras diferentes indican estadísticamente diferencias significativas ($p < 0,05$).

5.1.3. Acción biológica del hongo endófito *Clonostachys* sp sobre *Meloidogyne incognita* en *Plukenetia volubilis*.

a. Cuantificación de nódulos

El Análisis de Varianza para el número de nódulos producidos por *Meloidogyne incognita* en plantas de sachá inchi, muestra efecto altamente significativo ^(**) en los tratamientos evaluados ($p < 0,05$) después de 45 días de haber sido incubadas a temperatura ambiente en invernadero, considerando el ciclo biológico del nemátodo (25 a 35 días). Datos transformados a raíz cuadrada, (Cuadro 9).

Cuadro 9: Análisis de varianza del número de nódulos producidos por *Meloidogyne incognita* en plantas de sachá inchi, después de 45 días de haber sido incubadas a temperatura ambiente en invernadero.

Fuente de variación	S.C	G.L	C.M	F. calculado	p-valor	Significancia
TRATAMIENTOS	56,48	15	3,77	17,3	<0,0001	**
Error	6,53	30	0,22			
Total	64,74	47				

**= Altamente significativo

$$R^2 = 90\%$$

$$CV = 14,29\%$$

$$\bar{X} = 12 \text{ nódulos}$$

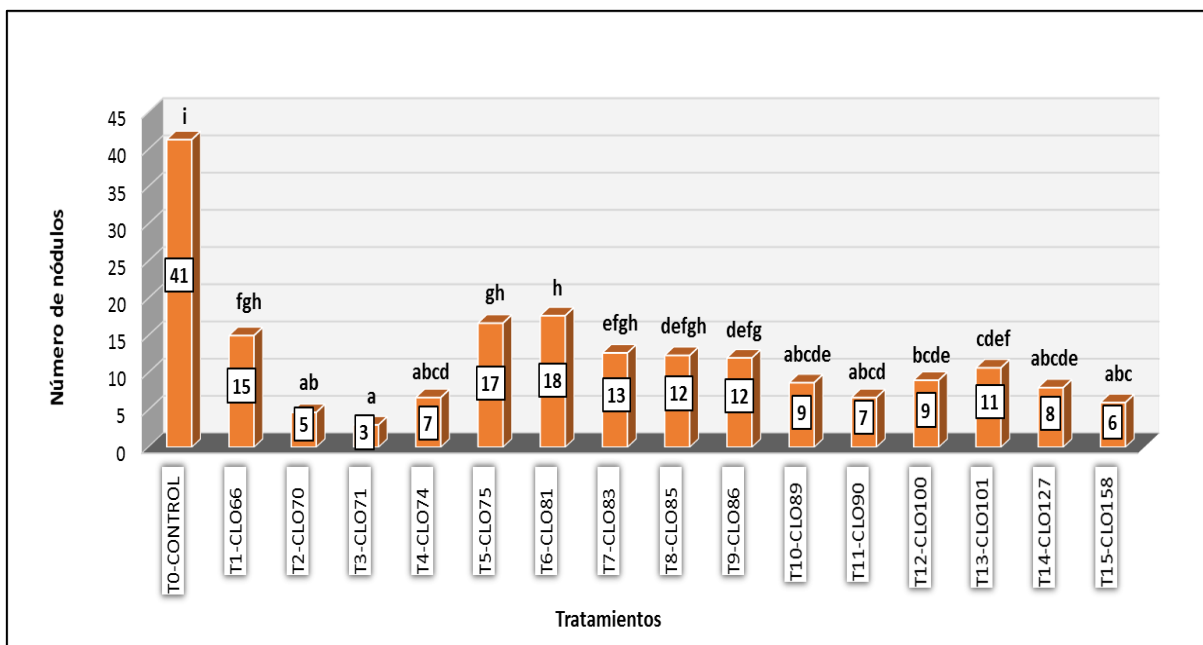


Figura 18: Prueba de Duncan ($p < 0,05$) para el número de nódulos producidos por *Meloidogyne incognita* en plantas de sachá inchi después de 45 días de haber sido incubadas a temperatura ambiente en invernadero, considerando el ciclo biológico del nemátodo (25 a 35 días). Las medias con letras diferentes indican estadísticamente diferencias significativas ($p < 0,05$).

b. Longitud de raíz de plantas de sachá inchi inoculadas con *Clonostachys* sp

El Análisis de Varianza para la longitud de raíz de plantas de sachá inchi (previamente determinada a través del programa Image Analysis Software for Plant Disease Quantification (ASSESS)), muestra efecto altamente significativo ^(**) en los tratamientos evaluados ($p < 0,05$) después de 45 días de haber sido incubadas a temperatura ambiente en invernadero. (Cuadro 10).

Cuadro 10: Análisis de varianza de la longitud de raíz (cm) de plantas de sachá inchi, después de 45 días de haber sido incubadas a temperatura ambiente en invernadero.

Fuente de variación	S.C	G.L	C.M	F. calculado	p-valor	Significancia
TRATAMIENTOS	13,52	15	0,9	8,29	<0,0001	**
Error	3,26	30	0,11			
Total	16,79	47				

**= Altamente significativo

$$R^2 = 81\%$$

$$CV = 9,26\%$$

$$\bar{X} = 13,06\text{cm}$$

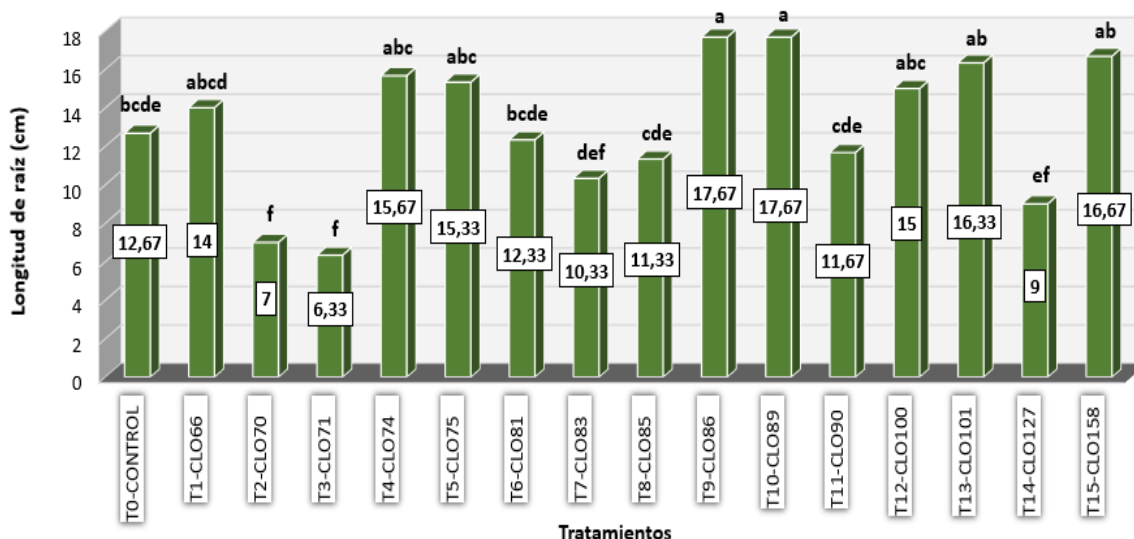


Figura 19: Prueba de Duncan ($p < 0,05$) para la longitud de la raíz (cm) de plantas de sachá inchi después de 45 días de haber sido incubadas a temperatura ambiente en invernadero. Las medias con letras diferentes indican estadísticamente diferencias significativas ($p < 0,05$).

c. Altura de plantas de *Plukenetia volubilis*

El Análisis de Varianza para la altura de plantas de sachá inchi, evaluadas cada cinco días durante un mes y medio, muestra efecto altamente significativo (**) en los tratamientos evaluados ($p < 0,05$) después de 45 días de haber sido puestas en desarrollo a temperatura ambiente en invernadero. (Cuadro 11).

Cuadro 11: Análisis de varianza de la altura (cm) de plantas de sachá inchi, después de 45 días de haber sido puestas en desarrollo a temperatura ambiente en invernadero.

Fuente de variación	S.C	G.L	C.M	F. calculado	p-valor	Significancia
TRATAMIENTOS	15,96	15	1,06	7,84	<0,0001	**
Error	4,07	30	0,14			
Total	20,43	47				

**= Altamente significativo

$$R^2 = 80\% \quad CV = 16,03\% \quad \bar{X} = 5,70 \text{ cm}$$

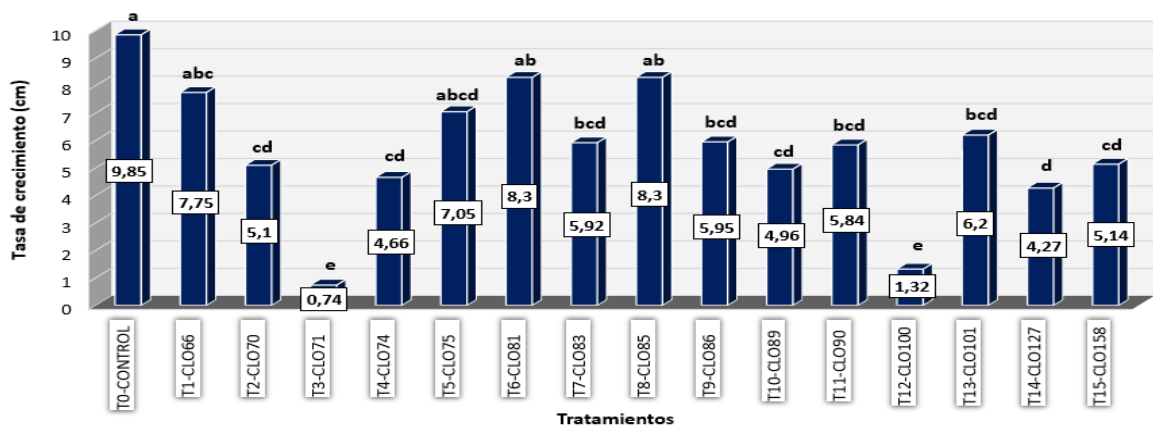


Figura 20: Prueba de Duncan ($p < 0,05$) para la altura (cm) de plantas de sachá inchi después de 45 días de haber sido puestas en desarrollo a temperatura ambiente en invernadero, indicando una tasa de crecimiento de la altura cada

cinco días por aislamiento. Las medias con letras diferentes indican estadísticamente diferencias significativas ($p < 0,05$).

5.1.4. Capacidad del hongo endófito *Clonostachys* sp de inducir tolerancia en plantas de *Plukenetia volubilis* al estrés hídrico

a. Porcentaje de agua de plantas de sachá inchi colonizadas con *Clonostachys* sp.

El Análisis de Varianza para el porcentaje de agua de plantas de sachá inchi, evaluadas a partir de 60 d.d.s durante un mes y medio, muestra efecto significativo (*) en los tratamientos evaluados después de 45 días de haber sido puestas a evaluación a temperatura ambiente en vivero. (Cuadro 12).

Cuadro 12: Análisis de varianza del porcentaje de agua de plantas de sachá inchi, después de 45 días de haber sido puestas a evaluación a temperatura ambiente en vivero.

Fuente de variación	S.C	G.L	C.M	F. calculado	p-valor	Significancia
TRATAMIENTOS	0,8	16	0,05	2,03	0,0147	*
Error	3,54	144	0,02			
Total	4,72	169				

*= Significativo

$$R^2 = 25\%$$

$$CV = 21,81\%$$

$$\bar{X} = 64,92\%$$

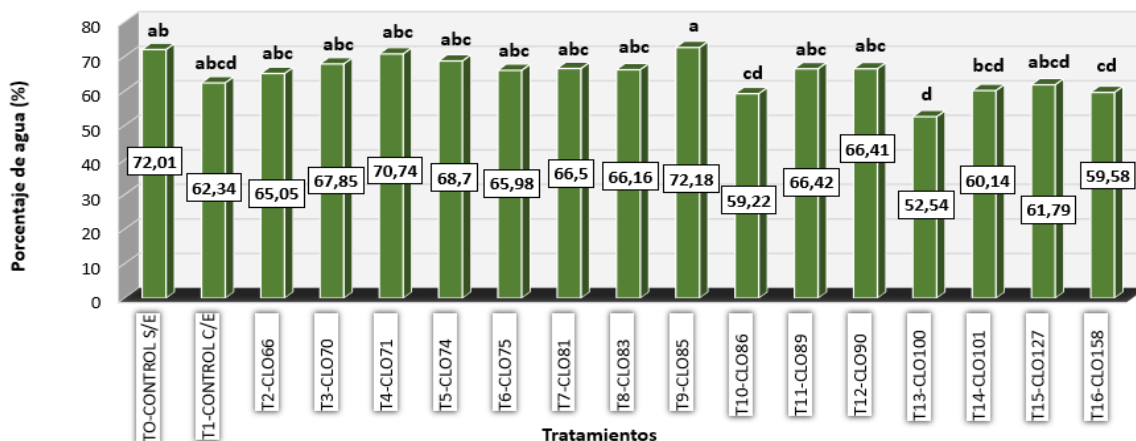


Figura 21: Prueba de Duncan ($p < 0,05$) para el porcentaje de agua (%) de plantas de sachá inchi, después de 45 días de haber sido puestas a evaluación a temperatura ambiente en vivero.

b. Longitud de raíz de plantas de sachá inchi colonizados con *Clonostachys* sp.

El Análisis de Varianza para la longitud de raíz de plantas de sachá inchi, muestra efecto significativo (*) en los tratamientos evaluados después de 45 días de haber sido puestas a evaluación a temperatura ambiente en vivero. (Cuadro 15).

Cuadro 13: Análisis de varianza de la longitud de raíz de plantas de sachá inchi, después de 45 días de haber sido puestas a evaluación a temperatura ambiente en vivero.

Fuente de variación	S.C	G.L	C.M	F. calculado	p-valor	Significancia
TRATAMIENTOS	10,73	16	0,67	2,89	0,0004	*
Error	33,36	144	0,23			
Total	46,87	169				

*= Significativo

$$R^2 = 29\%$$

$$CV = 10,98\%$$

$$\bar{X} = 19,48 \text{ cm}$$

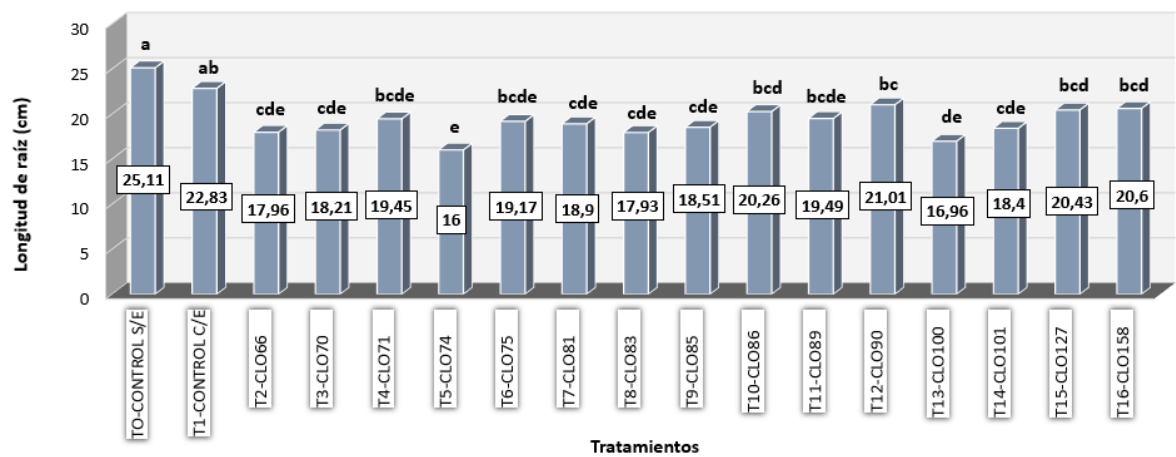


Figura 22: Prueba de Duncan ($p < 0.05$) para la longitud de raíz (cm) de plantas de sachá inchi, después de 45 días de haber sido puestas a evaluación a temperatura ambiente en vivero.

5.2. Discusiones

5.2.1. Capacidad endofítica de *Clonostachys* sp colectada de plántulas de *Plukenetia volubilis*.

Todas las cepas de *Clonostachys* sp lograron colonizar las plantas de sachá inchi, los tratamientos que mayor porcentaje de colonización endofítica alcanzaron se encuentran el T2 (T8-CLO70) y T1 (T14-CLO127) con 100 y el 73,33% de capacidad de colonización endofítica respectivamente (figura 12), y según Moreira *et al.*, (2014) menciona que *Clonostachys*, especialmente de la especie *Clonostachys rosea*, es capaz de colonizar raíces, tallos, vainas, hojas y semillas de varias especies de plantas, teniendo la capacidad de permanecer endofíticamente, aparte reportando que es endófito en raíces de otros cultivos como trébol rojo, fresa y hojas de frambuesa.

5.2.2. influencia del hongo endófito *Clonostachys* sp como promotor de crecimiento de plántulas de *Plukenetia volubilis*.

a. Altura de plantas de sachá inchi colonizadas con *Clonostachys* sp.

Todas las cepas de *Clonostachys* sp, tuvieron altura superior a la del T0 (T0-CONTROL), en plantas de sachá inchi, entre los tratamientos que mayor altura presentaron se encuentran el T14 (T14- CLO127) y T10 (T10-CLO89) con 24,17 y 20,96 cm de longitud de raíz (figura 13), Moreira *et al.*, (2014) menciona que una característica importante de *Clonostachys* sp, es su capacidad para promover el crecimiento de diferentes especies de plantas, como por ejemplo, aumentó el crecimiento y producción de rosales, geranios, pepinos y plantas de tomate.

b. Área foliar de plantas de sachá inchi colonizados con *Clonostachys* sp.

El tratamiento que mejor área foliar presentó fue el T0 (T0-CONTROL) con 81,32 cm², seguidamente del tratamiento T13 (T13-CLO101) con 68,8 cm² de área foliar (figura 14), en tanto Moreira *et al.*, (2014) menciona que analizaron nutrientes en hojas de tomate detectado contenido de fósforo y nitrógeno después de la aplicación del antagonista. Al parecer, el antagonista con especies vegetales tiene interacción específica.

c. Número de hojas por planta de sachá inchi colonizados con *Clonostachys* sp.

Para el número de hojas por planta de sachá inchi, el mejor tratamiento fue el T14 (T14-CLO127) con 23 hojas por planta, y teniendo al T0 (T0-CONTROL) con 17 hojas por planta (figura 15), pero estadísticamente todos los tratamientos se encuentran en un rango de 15 a 23 hojas por planta, lo que indica que puede que haya habido promoción en la formación de hojas por parte de las cepas de *Clonostachys* sp, sobre las plantas de sachá inchi.

d. Peso de biomasa fresca total de plantas de sachá inchi colonizadas con *Clonostachys* sp.

Para el peso de biomasa fresca total de plantas de sachá inchi, el mejor tratamiento fue el T9 (T9-CLO86) con 12,91 g de peso total de biomasa fresca, en tanto el T0 (T0-CONTROL) obtuvo 10,35 g (figura 16), lo que indica que las cepas de *Clonostachys* sp, hayan ejercido algún

mecanismo de nutrición foliar ya que Moreira *et al.*, (2014) analizaron nutrientes en las hojas de tomate detectado el contenido de fósforo y nitrógeno después de la aplicación de *Clonostachys* sp. La aplicación de antagonista en plantas de tomate también aumentó en campo, evaluados 30 días después de la siembra.

e. Longitud de raíces de plantas de sachá inchi colonizadas con *Clonostachys* sp.

Para la longitud de raíces de plantas de sachá inchi el mejor tratamiento fue el T14 (T14-CLO127) con 24,07 cm, en tanto en T0 (T0-CONTROL) obtuvo 16,56 cm de longitud de raíz (figura 17), por lo que Moreira *et al.*, (2014) menciona que otra característica importante de *Clonostachys* sp, es su capacidad para promover el crecimiento de diferentes especies de plantas, como, por ejemplo, aumentó el crecimiento y producción de rosales, geranios, pepinos y plantas de tomate.

5.2.3. Acción biológica del hongo endófito *Clonostachys* sp sobre *Meloidogyne incognita* en *Plukenetia volubilis*.

a. Cuantificación de nódulos

De acuerdo a la (figura 18), las cepas estudiadas de *Clonostachys* sp, muestran un número de nódulos muy por debajo del control (T0-CONTROL), que fue el que más número de nódulos presentó (41), en cambio los tratamientos que menor número de nódulos presentaron fueron el T3 (T3-CLO71), T2 (T2-CLO70) y T15 (T15-CLO158) con 3, 5 y seis nódulos respectivamente; França (2011) menciona que *Clonostachys*

rosea es antagonista de nemátodos, y puede parasitar quistes de *Heterodera* spp y *Globodera* spp Y que bajo microscopía fluorescente visualizó que las conidias de un aislamiento de *C. rosea* estaban adheridas a la cutícula del nemátodo, germinando y el germen de tubos penetraron en el cuerpo de los nemátodos, quienes fueron inmovilizados y murieron, o muy probablemente cepas de *Clonostachys* sp, endófito deriven alguna enzima o metabolito secundario que de alguna manera tenga algún grado de control en el ingreso de *Meloidogyne incognita* a las raíces.

b. Longitud de raíz de plantas de sachá inchi infestadas con *Meloidogyne incognita*

Para la longitud de raíz, entre los tratamientos los que mejor longitud de raíz mostraron fueron el T9 (T9-CLO86) y el T10 (T10-CLO89) ambos con 17,67 cm de longitud de raíz (figura 19); mientras que el T0 (T0-CONTROL), se mostró en un rango medio con 12,67 cm de longitud de raíz, que tiene relación con Gonzales 2015, donde menciona que reduce o suprime la población de nemátodos; describe también sobre el potencial de microorganismos del endófito, asimismo se corrobora que *Clonostachys* no es un patógeno de planta.

c. Altura de plantas de sachá inchi inoculadas con *Clonostachys* sp

La altura (cm) de cada planta de sachá inchi colonizado con cepas de *Clonostachys* sp, indica una tasa de crecimiento cada cinco días (figura 20), mediante la cual el T0 (T0-CONTROL) mostró una tasa de

crecimiento de 9,85 cm (altura) cada cinco días en plantas de sachá inchi, por lo cual Moreira *et al.*, (2014) menciona que otra característica importante de *Clonostachys* sp, es su capacidad para promover el crecimiento de diferentes especies de plantas, como por ejemplo, aumentó el crecimiento y producción de rosales, geranios, pepinos y plantas de tomate. Al parecer, el antagonista de la interacción especies por vegetales y aislados de especies de plantas antagonista es específica, entonces no se puede atribuir que las cepas hayan tenido un efecto positivo en la tasa de crecimiento de altura y diámetro de plantas de sachá inchi cada cinco días, ya que el control fue el que tuvo el mejor resultado. Sus metabolitos secundarios y si diversa actividad biológica se corrobora por Sánchez et al 2013.

5.2.4. Capacidad del hongo endófito *Clonostachys* sp, de inducir tolerancia en plántulas de *Plukenetia volubilis* al estrés hídrico

a. Porcentaje de agua de plantas de sachá inchi colonizadas con *Clonostachys* sp.

Las cepas de *Clonostachys* sp, generalmente se comportaron en un rango estadístico parecido entre 52,22 y 72,58% de agua de plantas de sachá inchi teniendo (figura 21).

b. Longitud de raíz de plantas de sachá inchi colonizados con *Clonostachys* sp.

Las cepas de *Clonostachys* sp, generalmente se comportaron en un rango estadístico parecido, teniendo al tratamiento T12 (T12-CLO90) con

21,01cm de longitud de raíz de plantas de sachá inchi, como tratamiento cercano al T0 (T0-CONTROL Sin/Estrés) y T1 (T1-CONTROL Con/Estrés) con 25,11 y 22,83 cm de longitud de raíz quienes obtuvieron mejor longitud de raíces (figura 22).

VI. CONCLUSIONES

- 6.1.** Todas las cepas obtenidas del tallo de las plántulas de *Plukenetia volubilis* lograron colonizar obteniendo diferentes porcentajes de colonización, siendo el T2 (CLO70) el tratamiento que logró colonizar al 100%.
- 6.2.** Todas las cepas obtuvieron altura superior al control (T0) teniendo como mejor tratamiento al T14 (T14-CLO127) con 24,17 cm, para área foliar no se ha encontrado respuesta favorable porque muestra como mejor tratamiento al T0 (T0-CONTROL) con 81,32 cm². Para número de hojas por planta se tiene como mejor tratamiento al T14 (T14-CLO127) con 23 hojas por planta (figura 15). Para peso de biomasa fresca se obtuvo como mejor tratamiento al T9 (T9-CLO86) con 12,91 g (figura 16). Y para longitud de raíz, se obtuvo como mejor tratamiento al T14 (T14-CLO127) con 24,07 cm.
- 6.3.** Se obtuvo buenos resultados en todas las variables estudiadas, en tanto para la cuantificación de nódulos como mejor tratamiento al control (T0-CONTROL), entonces decimos que las cepas de *Clonostachys* sp, ejercieron algún tipo de acción biológica sobre *Meloidogyne incognita*, que impidió que este formará nódulos en las plantas evaluadas.
- 6.4.** Para la longitud de la raíz de plantas de sachá inchi se concluye que se obtuvo como mejores tratamientos a T9 (T9-CLO86) y T10 (T10-CLO89) ambos con 17,67 cm de longitud lo que indica que posiblemente las cepas

estudiadas ejercieran algún tipo de protección para que *Meloidogyne incognita* no afecte radicalmente a las plantas evaluadas.

- 6.5.** Para el porcentaje de agua de plantas de sachá inchi, el resultado no fue lo esperado todos los tratamientos obtuvieron un resultado parecido, y para la longitud de raíz de plantas de sachá inchi el mejor tratamiento fue el control (T0-CONTROL Sin/Estrés) con 25,11 cm, pero los demás tratamientos obtuvieron un resultado similar.

VII. RECOMENDACIONES

- 7.1. Estudiar más profundamente a *Clonostachys* sp, porque se está comprobando que es un hongo endofítico que se desarrolla dentro de las plantas de sachá inchi y tiene una buena colonización.
- 7.2. Realizar ensayos con *Clonostachys* sp para determinar la influencia de promover crecimiento en otros cultivos importantes de la región y del país y de esta manera contribuir con la mejor producción en las variedades cultivables.
- 7.3. Realizar estudios con *Clonostachys* sp sobre *Meloidogyne incognita* con el fin de ser una alternativa para contribuir a disminuir incidencia de esta enfermedad; además, en otros cultivos también pueden ser estudiados.
- 7.4. Realizar evaluaciones para diferentes cultivos con *Clonostachys* sp de inducir tolerancia al estrés hídrico, ya que en *Plukenetia volubilis* no obtuvimos buenos resultados, porque es un cultivo resistente a la sequía.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

1. Arévalo G. (2000). *El cultivo del sachu inchi (Plukenetia volubilis L.) en la amazonía. INIA-Programa Nacional de Investigación en Recursos Genéticos y Biotecnología - PRONARGE, Estación Experimental El Porvenir. Tarapoto.*
2. Agrios, G. (2005). *Plant Pathology. Fifth Edition. Department of Plant Pathology University of Florida. United States of America.*
3. Bandara, W.; Seneviratne, G.; Kulasoorya, A. (2006). *International among endophytic bacteria and fungi: effect and potentials. J. Biosci 31:645-650.*
4. Bary, A. in *Morphologie und physiologie der pilze, flechten, und myxomyceten. Hofmeister's handbook of physiological botany (Leipzig, Germany, Engelmann, 1866).*
5. Bettiol, W. (1991). *Controle Biológico de Doenças de Plantas. (Ed.). Jaguariúna. EMBRAPA-CNPDA.*
6. Cave, D. (1995) – “*Control Biológico Ayer, Hoy y Siempre*”. Pág. 186 – 191; Editor CATIE. 1º Edición; Costa Rica 1995.
7. Clay, K. Fungal endophytes of grasses: *A defensive mutualism between plants and fungi. Ecology 69, 10-16 (1988).*
8. Christie, R., *Plant nematodes, their bionomics and control*, Agric. Exp. Sta., Universidad de Florida, Gainesville, 1959.
9. Franca, E. (2011). *Promoção do Crescimento de Plantas Mediada Por Clonostachys rosea, Viçosa, Minas Gerais Brasil.*

10. Funk, R., Halisky, M., Ahmad, S. & Hurley, H. *in How endophytes modify turfgrass performance and response to insect pests in turfgrass breeding and evaluation trials* (ed. Lemaire, E.) 137-145 (Avignon, France 1985).
11. Gonzales, A., (2015). *Aislamiento e identificación de hongos endófitos de la especie Piper aduncum (piperaceae) y su actividad bactericida antagónica frente a distintas cepas microbianas*, Universidad Tecnológica De Pereira, Facultad De Tecnología, Escuela De Tecnología Química, Programa Química Industrial, Pereira - 2015.
12. Guetsky, D. Shtienberg, Y., Elad, E., Fischer y Dinoor A. (2002). *Improving biological control by combining biocontrol agents each with several mechanisms of disease suppression*. Phytopathology 92, 976 – 985.
13. Hoopen, M., Rees, P. Aisa, T., Stirrup y Krauss U. (2003). *Population dynamics of epiphytic mycoparasites of the genera Clonostachys and Fusarium for the biocontrol of black pod (Phytophthora palmivora) and moniliasis (Moniliophthora roreri) on cocoa (Theobroma cacao)*. Mycological Research 107 (5): 587 – 596.
14. Lübeck, M., Knudsen, B., Jensen, U., Thrane, C., Janvier, Jensen, D. (2002). *GUS and GFP transformation of the biocontrol strain Clonostachys rosea IK726 and the use of these marker genes in ecological studies*. Mycological Research 106 (7): 815 – 826.
15. Manco, I. (2006). *Cultivo de Sacha Inchi*, Ministerio de Agricultura, Instituto Nacional de Investigación y Extensión Agraria, Subdirección de Recursos Genéticos y Biotecnología, Estación Experimental Agraria “El Porvenir” - Tarapoto

16. Márquez-Dávila K; Bailey B; Arévalo G.; Stream M; Samuels G. J y Olivera C. (2010). *Antibiosis de Clonostachys spp. Endófito contra los principales patógenos del cacao*. Resúmenes XXI Congreso Peruano de Fitopatología – Tarapoto.
17. Márquez, K., Cayotopa, J., Arévalo G., Vivanco U., Arévalo J. (2007). *Diagnóstico y niveles de inóculo del nematodo que afecta a la raíz de sacha inchi (Plukenetia volubilis) en el Perú*. Fitopatología Vol. 42. N° 2: 52.
18. Morandi, M. Sutton y Maffia. (2000). *Effects of host and microbial factors on development of Clonostachys rosea and control of Botrytis cinerea in rose*. European Journal of Plant Pathology 106: 439 – 448.
19. Moreira, R., França P., Vitorino, Á., & Maffia, A. (2014). *Uso e perspectiva de Clonostachys rosea como agente de biocontrol*. REVISTA DE CIENCIAS AGRÍCOLAS Volumen 31 (1) :, Pág. 78 - 91.
20. Nobre, S., Maffia, E., Mizubuti, L. Cota y Dias. (2005). *Selection of Clonostachys rosea isolates from Brazilian ecosystems effective in controlling Botrytis cinerea*. Biological control 34: 132 – 143.
21. Okuda, J., Kohno, N. Kishi, Y., Asai, M., Nishio y Komatsubara. (2000). *Production of TMC-151, TMC-154 and TMC-171, a new class of antibiotics, is specific to “Gliocladium roseum” group*. Mycoscience 41: 239 – 253.
22. Pionteli, L., y Giusiano S., (2003). *Notas micológicas VI: Selección de microhongos asociados a material vegetal y queratina desde Argentina y Chile*. Boletín Micológico 18: 89 – 99.

23. Rodríguez, M., Cabrera, C., Gozzo, M., Eberlin y A. Godeas. (2011). *Clonostachys rosea* BAFC3874 as a *Sclerotinia sclerotiorum* antagonist: mechanisms involved and potential as a biocontrol agent. *Journal of Applied Microbiology* 110 (5): 1177 – 1186.
24. Rodríguez, R., White, J., Arnold, E. & Redman, R. Fungal endophytes: Diversity and ecological roles. *New. Phytol.* 182, 314-330 (2009).
25. Rodríguez, R., Chico, R., (2013). *Efecto antagónico in vitro de Clonostachys rosea sobre Botrytis cinerea procedente de cultivos de Vitis vinífera*. REBIOL 2013; 33(2): 42-49, Julio – Diciembre Revista Científica de la Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Nacional de Trujillo. Trujillo. Perú
26. Sanchez, R.; Sanchez, L.; Sandoval, K.; Ulloa, A.; Armendariz, B.; Garcia, C.; Macias, L. (2013). *Hongos endófitos: fuente potencial de metabolitos secundarios bioactivos con utilidad en agricultura y medicina*. 1Departamento de Productos Naturales, Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México. Circuito Exterior, Ciudad Universitaria, Deleg. Coyoacán, Mexico. D.R. © TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas, 16(2):132-146,
27. Sasser, J. M. “*Nemtoide diseases of plantas and their control including the important role nematicides*” en *Pesticides in the Enviroment*, vol. 2, R. White – Stevens Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1976.
28. Schroers, H., Samuels, G., Seifer, K. y Gams, W. (1999). *Classification of the mycoparasite Gliocladium roseum in Clonostachys as C. rosea, its*

- relationship to Bionectria ochroleuca, and notes on other Gliocladium-like fungi. Mycologia 91 (2): 365 – 385.*
29. Shi, Y.; Lou, K.; Li, C. (2009). *Promotion of plant growth by phytohormone producing endophytic microbes of sugar beet. Biol Fertil Soils. 45:645-653.*
 30. Sutton, J., Liu W., Huang R. y Owen-Going, (2002). *Ability of Clonostachys rosea to establish and suppress sporulation potential of Botrytis cinerea in deleafed stems of hydroponic greenhouse tomatoes. Biocontrol Sci. Technol. 12: 413-425.*
 31. Talavera, M. (2003). *“Manual de Nematología Agrícola – Introducción al Análisis y al Control Nematológico para Agricultores y Técnicas de Agrupaciones de Defensa Vegetal”.* Institut de Recerca i Formació agrària i pesquera. Conselleria d' Agricultura i Pesca de les illes Balears. Pág. 1 – 9. Brasil 2003.
 32. Torres, C. (2003) – *“Principales Nematodos Fitoparásitarios”* Pág. 1 – 3; Editor SENASA. 1º Edición; Lima - Perú 2003.
 33. Zaldúa, A. (2012). *Caracterización de cepas de Clonostachys rosea para el control de Botrytis cinerea en viveros de Eucalyptus globulus.* Universidad de Concepción. Chile.
 34. Yu, H. y Sutton, J. (1998). *Effects of inoculum density, wetness duration, and temperature on control of Botrytis cinerea by Gliocladium roseum in raspberry. Canadian Journal of Plant Pathology 20: 243 – 252.*

ANEXOS

Anexo 1: Fotos de la tesis



Foto 1: Capacidad del hongo endófito *Clonostachys* sp de inducir tolerancia en plántulas de sachá inchi al estrés hídrico. En la figura podemos observar plantas de sachá inchi podadas a 20 cm de altura.



Foto 2: Capacidad del hongo endófito *Clonostachys* sp como promotor de crecimiento de plántulas de sachá inchi. En la figura podemos observar la altura promedio de los tratamientos y el desarrollo de la raíz en estudio.



Foto 3: Determinar la capacidad endofítica de *Clonostachys* sp colectada de sachá inchi. En la figura podemos observar la siembra de tejido de la planta de sachá inchi, colonizadas en placas Petri.